



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN
Y DE LA SALUD ANIMAL

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA
INSTITUTO NACIONAL DE CIENCIAS MÉDICAS Y NUTRICIÓN SALVADOR
ZUBIRÁN

***Alternativas para incrementar la estabilidad
oxidativa en huevo para plato enriquecido con
ácidos grasos omega 3***

TESIS

que para optar por el Grado de Doctora en Ciencias
presenta

Silvia Carrillo Domínguez

Tutor: Fernando Pérez-Gil Romo (INCMNSZ, FMVZ-UNAM)
Comité Tutorial: Ernesto Avila González (FMVZ-UNAM)
Carlos Vásquez Peláez (FMVZ-UNAM)

México D.F.

Septiembre 2013



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Dedicatorias

A mi Dios, Padre y Amigo Jehová Dios, por ser tan bueno conmigo, por permitirme concluir una etapa más de mi vida y por todas las cosas maravillosas que me ha dado.

A mis queridos padres (Ricardo y María), a mis queridos y preciosos hijos (Marianita y Jonny, a mis queridos hermanos (Javo, Rosy y Lauris), por todo su amor y apoyo que siempre me han brindado. Sin su ayuda no hubiese sido posible terminar este trabajo. Los quiero mucho.

Agradecimientos

“Mejor es el fin de un asunto, posteriormente, que su principio” (Eclesiastes 7:8), comparto tal opinión, por eso estoy feliz de haber concluido ya con este trabajo, pero deseo expresar mi agradecimiento,

A mi Dios Jehová por haberme puesto en el camino a muchas personas que, de una u otra manera, me ayudaron a realizar y concluir este trabajo.

Al Dr. Fernando Pérez-Gil Romo, por su amistad, apoyo y confianza que ha depositado en mi persona, gracias por ser un gran maestro, jefe y amigo. Gracias por el gran apoyo que siempre me ha brindado y en particular para poder realizar mis estudios de Doctorado. Gracias por compartir sus valiosos conocimientos. He aprendido mucho de Usted.

Al Dr. Ernesto Avila González por sus valiosos consejos, por su confianza, amistad y por ser un gran maestro.

Al Dr. Carlos Vásquez P. por su paciencia, confianza, sugerencias y consejos.

A la Dra. Margarita Casas Váldez del Centro Interdisciplinario de Ciencias Marinas, IPN en La Paz, Baja California Sur, México por el apoyo para la recolección de las algas marinas y sobre todo por su amistad.

A mí querida Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecni (UNAM), donde he pasado grandes momentos y hermosas etapas de mi vida.

Al Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán por contribuir de manera importante en mi formación profesional y por su apoyo para poder realizar mis estudios de Doctorado.

Al CONACyT por haberme apoyado con una beca económica para poder realizar mis estudios de Doctorado.

A BASF Mexicana SA de CV por haberme apoyado con la donación de la vitamina E y el CLA.

A mis sínodales, Dr. Carlos López Coello, Dr. Antonio Díaz, Dra. Raquel Guinzberg, Dr. Mariano González Alcorta por sus valiosos consejos para mejorar este trabajo.

Al Depto. de Nutrición Animal “Dr. Fernando Pérez-Gil Romo”, del Instituto Nacional de la Nutrición Salvador Zubirán.

Al personal del Centro de Extensión e Investigación en Ciencias Avícolas (CEIPAv) de la FMVZ, UNAM.

Al Depto.de Nutrición Animal y Bioquímica de la FMVZ, UNAM.

A tod@s y cada una de las personas que, de una u otra manera, me ayudaron en alguna de las etapas de este trabajo. No necesito nombrarlas, porque son muchas y no quisiera omitir el nombre de alguna de ellas, pero saben que les estoy enormemente agradecida.

A todos mis amig@s por su valiosa amistad, por sus palabras de ánimo, por compartir conmigo sus conocimientos y experiencia. Les agradezco de todo corazón su ayuda.

A toda mi hermosa familia.

“Si he visto más lejos, es porque estoy sentada sobre los hombros de gigantes”

(Isaac Newton)

Indice

Lista de Cuadros	viii
Lista de Figuras	xi
Abreviaturas	xii
Resumen	xiv
Abstract	xvi
I. Introducción	1
II. Revisión de Literatura	2
2.1 Generalidades sobre el estado de la salud pública en México	
2.2 Generalidades sobre los ácidos grasos omega 3	
2.3 Generalidades sobre el huevo	
2.4 Metabolismo de lípidos en las aves	
2.5 Ingredientes utilizados para incrementar el contenido de AGn3 en el huevo	
2.6 Oxidación lípidica	
2.7 Generalidades sobre los antioxidantes	
2.8 Antioxidantes utilizados para incrementar la estabilidad oxidativa en huevo enriquecidos con ácidos grasos omega 3	
2.7 Generalidades sobre las algas marinas	
2.8 Generalidades sobre el ácido linoleico conjugado (CLA)	
III. Referencias	48
IV. Objetivos	54
V. Hipótesis	55
VI. Artículos en proceso	
6.1 Efecto sobre la composición en ácidos grasos, características sensoriales y estabilidad oxidativa del huevo al suplementar la dieta para gallinas con aceite de sardina	56
6.2 Efecto sobre la composición en ácidos grasos, características sensoriales y estabilidad oxidativa del huevo al suplementar la dieta para gallinas con aceite	

de sardina y vitamina E	85
6.3 Efecto sobre la composición en ácidos grasos, características sensoriales y estabilidad oxidativa del huevo al suplementar la dieta para gallinas con aceite de sardina y algas marinas.....	116
6.4 Efecto sobre la composición en ácidos grasos, características sensoriales y estabilidad oxidativa del huevo al suplementar la dieta para gallinas con aceite de sardina y ácido linoleico conjugado	150
VII. Artículos publicados	179
7.1 Effects of adding vitamin E to diets supplemented with sardine oil sardine oil on the production of laying hens and egg fatty acid composition. African Journal of Food Science 61 (1):12-19 (2012).	
7.2 Modificación en la composición de ácidos grasos del huevo al incluir aceite de sardina y ácido linoleico conjugado en dietas para gallinas ponedoras. Archivos de Medicina Veterinaria 44:243-251 (2012).	

Lista de Cuadros

- Cuadro 1. Ácidos grasos insaturados más comunes
- Cuadro 2. Contenido de ácidos grasos omega 3 en algunas especies de pescado, crustáceos y moluscos comestibles (g/100g de porción comestible)
- Cuadro 3. Composición de la yema de huevo
- Cuadro 4. Ácidos grasos presentes en el huevo de gallina (g/100g)
- Cuadro 5. Antioxidantes que actúan en un segundo nivel de defensa
- Cuadro 6. Composición porcentual de la dieta base

Cuadros presentes en el artículo 1

- Cuadro 7. Composición en ácidos grasos de los aceites y las dietas
- Cuadro 8. Variables productivas y color de la yema obtenidos al suplementar la dieta para gallinas ponedoras con aceite de sardina
- Cuadro 9. Contenido de lípidos totales y composición en ácidos grasos del huevo al suplementar la dieta para gallinas ponedoras con aceite de sardina

Cuadros presentes en el artículo 2

- Cuadro 10. Composición porcentual de la dieta base
- Cuadro 11. Composición en ácidos grasos de los aceites y las dietas
- Cuadro 12. Variables productivas y color de la yema obtenidos al suplementar la dieta para gallinas ponedoras con aceite de sardina junto con vitamina E
- Cuadro 13. Contenido de lípidos totales y composición en ácidos grasos del huevo al suplementar la dieta para gallinas ponedoras con aceite de sardina junto con vitamina E

Cuadros presentes en el artículo 3

- Cuadro 14. Composición porcentual de las dietas
- Cuadro 15. Composición en ácidos grasos de los aceites y el alga marina
- Cuadro 16. Composición en ácidos grasos de las dietas

Cuadro 17. Variables productivas y color de la yema obtenidos al suplementar la dieta para gallinas ponedoras con aceite de sardina junto con algas marinas *Sargassum* spp

Cuadro 18. Contenido de lípidos totales y composición en ácidos grasos del huevo al suplementar la dieta para gallinas ponedoras con aceite de sardina junto con algas marinas *Sargassum* spp

Cuadros presentes en el artículo 4

Cuadro 19. Composición porcentual de la dieta base

Cuadro 20. Composición en ácidos grasos de los aceites

Cuadro 21. Composición en ácidos grasos de las dietas

Cuadro 22. Variables productivas y color de la yema obtenidos al suplementar la dieta para gallinas ponedoras con aceite de sardina junto con ácido linoleico conjugado (CLA)

Cuadro 23. Contenido de lípidos totales y composición en ácidos grasos del huevo al suplementar la dieta para gallinas ponedoras con aceite de sardina junto con ácido linoleico conjugado (CLA)

Lista de Figuras

- Figura 1. Estructura del ácido oleico
- Figura 2. Configuración *cis* o *trans* de un ácido graso
- Figura 3. Estructura del ácido linoleico y de sus isómeros c9,t11 y t10, c12
- Figura 4. Estructura del ácido alfa-linolénico
- Figura 5. Ruta metabólica de las principales familias de ácidos grasos insaturados
- Figura 6. Síntesis de eicosanoides a partir del ácido araquidónico
- Figura 7. Formación de eicosanoides a partir del ácido eicosapentaenoico
- Figura 8. Estructura del huevo de gallina
- Figura 9. Ruta metabólica de los ácidos grasos en las aves
- Figura 10. Mecanismo de oxidación de los ácidos grasos insaturados
- Figura 11. Algas del género *Sargassum*

Figuras presentes en el artículo 1

- Figura 12. Concentración de malondialdehido (MDA) en la yema de huevo conservado a temperatura ambiente durante 60 días, al suplementar la dieta de las gallinas con aceite de sardina

Figuras presentes en el artículo 2

- Figura 13. Aceptación por el color de la yema y sabor del huevo al suplementar la dieta de las gallinas con aceite de sardina y vitamina E
- Figura 14. Concentración de malondialdehido (MDA) en la yema de huevo conservado a temperatura ambiente durante 60 días, al suplementar la dieta de las gallinas con aceite de sardina junto con vitamina E

Figuras presentes en el artículo 3

- Figura 15. Aceptación por el color de la yema y sabor del huevo al suplementar la dieta de las gallinas con aceite de sardina y algas marinas

Figura 16. Concentración de malonaldehído (MDA) en la yema de huevo conservado a temperatura ambiente durante 60 días, al suplementar la dieta de las gallinas con aceite de sardina junto con algas marinas *Sargassum* spp

Figuras presentes en el artículo 4

Figura 17. Aceptación por el color de la yema y sabor del huevo al suplementar la dieta de las gallinas con aceite de sardina y ácido linoleico conjugado (CLA)

Figura 18. Concentración de malondialdehído (MDA) en la yema de huevo conservado a temperatura ambiente durante 60 días, al suplementar la dieta de las gallinas con aceite de sardina junto con ácido linoleico conjugado (CLA)

Abreviaturas

AGn3 (Ácidos Grasos n3)
AG (Ácidos Grasos)
AGPI (Ácidos Grasos Poliinsaturados)
ALA (Ácido Alfa Linolenic, siglas en inglés)
AGL (Ácidos Grasos Libres)
AGS (Ácidos Grasos Saturados)
ANAPH (Asociación Nacional de Procesadores de Huevo)
BHA (Hidroxianisol butilato)
BHT (Butil Hidroxitolueno)
CAT (Catalasa)
CLA (Ácido Linoleico Conjugado, siglas en inglés))
CONAPESCA (Comisión Nacional de Pesca)
DHA (Ácido Docosaheptaenoico, siglas en inglés)
DNA (Ácido desoxiribonucleico, siglas en inglés))
EDTA (ácido etilendiaminotetraacético, siglas en inglés)
ECV (Enfermedades Cardiovasculares)
ENSANUT (Encuesta Nacional de Salud y Nutrición)
EPA (Ácido Eicosapentaenoico, siglas en inglés)
ERN (Especies reactivas al nitrógeno)
ERO (Especies reactivas al oxígeno)
FABP (Fatty Acid Binding Protein, siglas en inglés))
GSH-Px (Glutación Peroxidasa, siglas en inglés))
HDL (Lipoproteínas de alta densidad, siglas en inglés)
IDL (Lipoproteínas de densidad intermedia, siglas en inglés)
INEGI (Instituto Nacional de Estadística, Geografía e Informática)
LCAT (Lecitín-colesterol acil-transferasa)
LDL (Lipoproteínas de baja densidad, siglas en inglés)
LH (Lipasa Hepática)
LPL (Lipoproteinlipasa)
MDA (Malondialdehído)
RF (Radicales Libres, siglas en inglés)
SOD (Superóxido dismutasa)
TBHQ (Terbutil hidroxiquinona)
TBA (Ácido Tiobarbitúrico, siglas en inglés)
TBARS (Thiobarbituric acid reactive substances)
TDPA (Ácido Tiopropiónico, siglas en inglés)
TG (Triglicéridos)
UNA (Unión Nacional de Avicultores)
UV (Rayos Ultravioleta)
VE (Vitamina E)
VLDL (Lipoproteínas de muy baja densidad, siglas en inglés)

Siglas

kcal (kilocalorías)

mg (miligramos)

UI (Unidades Internacionales)

μg (microgramos)

g (gramos)

kg (kilogramos)

nm (nanómetros)

PM (Portomicrones)

QM (Quilomicrones)

nmol (nanomoles)

Alternativas para incrementar la estabilidad oxidativa en huevo para plato enriquecido con ácidos grasos omega 3

RESUMEN

Dado que el huevo es uno de los alimentos de mayor consumo en México y en muchas partes del mundo, actualmente se le utiliza como vehículo para hacer llegar a los consumidores nutrimentos tan importantes como los ácidos grasos omega 3 (AGn3), particularmente el eicosapentaenoico y docosahexenoico (EPA y DHA). Esto es posible, ya que al incorporar en la dieta de las aves ingredientes con un alto contenido de EPA y DHA, como el aceite de sardina(AS), éstos pueden ser depositados directamente en la yema de huevo. Sin embargo, el incremento en el contenido de estos AGn3 en los alimentos, aumenta también la susceptibilidad de éstos a la oxidación lipídica, una de las principales vías de deterioro de los alimentos que deriva, por lo general, en una pérdida de la calidad comercial, organoléptica y sanitaria del alimento. Por lo tanto, para mejorar la estabilidad de estos alimentos enriquecidos, se han venido adicionando algunos antioxidantes a la dieta de las aves. Los tocoferoles son los antioxidantes (AO) que mas frecuentemente han sido empleados; sin embargo, los resultados aun son contradictorios. Sin embargo, existen otros AO, como el ácido linoleico conjugado (CLA), o ingredientes, como las algas marinas, que poseen compuestos con propiedades AO, que también pueden ser una alternativa interesante a evaluar. El objetivo del presente estudio fue saber como se modifica la composición en ácidos grasos y las características organolépticas del huevo cuando se adiciona vitamina E (VE), algas marinas (AM) ó CLA a dietas suplementadas con 2.5% de aceite de sardina (AS) y si esta adición contribuye a incrementar la estabilidad oxidativa del huevo enriquecido con AGn3. Los resultados mostraron que: 1) suplementar la dieta con AS aumentó la concentración de EPA y DHA en el huevo y el color de la yema, pero también la oxidación lipídica y disminuyo la producción de huevo ($P < 0.05$), 2) adicionar 200 mg/kg de VE a la dieta suplementada con AS redujo la concentración de AGn3 en el huevo ($P < 0.05$), adicionar 100 mg/kg de VE no tuvo efecto alguno sobre la composición en AG del huevo y no redujo la oxidación lipídica en la yema cuando la dieta fue suplementada con AS ($P < 0.05$), 3) la adición de 4% y 8% de las algas marinas *Sargassum*

spp. incrementó el contenido de AGn3 en el huevo y la coloración de la yema ($P < 0.05$), pero redujo las variables productivas y no ayudaron a reducir la oxidación lipídica cuando la dieta fue suplementada con AS ($P > 0.05$), 4). La adición de 1% y 2% de CLA aumentó la concentración de AGn3 en el huevo pero también la oxidación lipídica, el color de la yema se redujo, las variables productivas también y el albumen adquirió un color rosado ($P < 0.05$). Respecto al uso de la vitamina E, de las algas marinas y del CLA, como alternativas para incrementar la estabilidad oxidativa en huevos enriquecidos con EPA y DHA, hace falta realizar más estudios para poder llegar a una conclusión, así como otras pruebas que permitan determinar con mayor precisión que compuestos se oxidaron y que productos de oxidación se formaron .

Alternatives to increase the oxidative stability in table eggs enriched with omega-3 fatty acids

ABSTRACT

Since the egg is one of the most consumed foods in Mexico and in many parts of the world, is currently used as a vehicle of important nutrients like omega-3 fatty acids (n3FA), particularly eicosapentaenoic and docosahexaenoic acids (EPA and DHA). This is possible because ingredients with a high content of EPA and DHA, such as sardine oil (SO), are added to poultry diets, these fatty acids (FA) can be deposited directly into the yolk. However, the susceptibility to lipid oxidation, main routes of degradation of foods, in egg lipids increase, and there is a loss of the quality, and organoleptic characteristic of foods. Therefore, to improve the stability of the n3FA enriched foods some antioxidants have been added to the laying hens diet. Tocopherols are the antioxidants (AO) which have been more frequently used, but the results are still contradictory. However, there are others, such as conjugated linoleic acid (CLA), or ingredients, such as seaweed, which have compounds with AO properties, they may also be an interesting alternative to evaluate. The aim of this study was to know how the egg fatty acid composition and egg organoleptic characteristics are modified when vitamin E (VE), marine algae (MA) or CLA are added to diets supplemented with 2.5% sardine oil (SO); and to know if this addition increases the oxidative stability of egg enriched with n3FA. The results showed that: 1) supplementing the diet with 2.5%SO, the egg yolk concentration of EPA and DHA and egg yolk color increased, but also the lipid oxidation, the egg production decreased ($P < 0.05$), 2) adding 200 mg / kg of VE to diets supplemented with SO reduced the n3FA egg content ($P < 0.05$), adding 100 mg/kg VE had no effect on egg FA composition and did not reduce lipid oxidation in the yolk when the diet was supplemented with SO ($P < 0.05$), 3) addition of 4% and 8% of *Sargassum* spp. increased the n3FA egg content and yolk color ($P < 0.05$), but some productive parameters were affected and lipid oxidation was not reduced when the diet was supplemented with SO ($P > 0.05$), 4) adding 1% CLA and 2%CLA increased the n3FA egg content, but also lipid oxidation in egg yolk, the egg yolk color was reduced, the productive parameters were affected and albumen had a pink color ($P < 0.05$). Further studies are necessary to obtain a conclusion regarding use of vitamin E, seaweed and CLA, as alternatives to increase the egg oxidative stability enriched with EPA and DHA, as well as other tests to determine which compounds were oxidized and that oxidation products were formed.

I.Introducción

La diabetes, las enfermedades cardiovasculares (ECV) y los tumores malignos ocupan los primeros lugares como causa de muerte en México. La importancia de los ácidos grasos omega tres (AGn3) en la prevención y protección que brindan ante estas enfermedades, ha sido ya muy bien documentada. Los AGn3 se encuentran principalmente en peces y crustáceos, pero en México al igual que en otros países, el consumo de los productos marinos es muy bajo (10.4 kg *per capita* anual); mientras que el de los productos avícolas, como el huevo, es elevado (22.8 kg *per capita* anual).

El huevo es uno de los alimentos de mayor consumo por su excelente valor nutritivo, por su precio que lo hace asequible a toda la población, por su versatilidad para ser preparado en muy diferentes formas, y es un importante ingrediente en la industria de los alimentos. Por ésta, y muchas otras razones más, el huevo es empleado actualmente como un vehículo para hacer llegar a los consumidores nutrimentos tan importantes para la salud como los AGn3.

Esto es posible, ya que al incorporar en la dieta de las aves ingredientes con un alto contenido de AGn3, éstos pueden ser depositados directamente en la yema de huevo. Sin embargo, el incremento en el contenido de AGn3 en los alimentos, aumenta también la susceptibilidad de éstos a la oxidación lipídica, una de las principales vías de deterioro de los alimentos que deriva, por lo general, en una pérdida de la calidad comercial, organoléptica y sanitaria del alimento.

Por lo tanto, para mejorar la estabilidad de estos alimentos enriquecidos, es necesario suplementar la dieta de las aves con antioxidantes. Los tocoferoles son los antioxidantes que mas frecuentemente han sido empleados; sin embargo, existen otras alternativas que también puede ser evaluadas como las algas marinas y el ácido linoleico conjugado (CLA).

A las algas marinas se les ha atribuido una importante actividad antioxidante. Algunos autores señalan que éstas poseen compuestos con capacidad para captar superóxidos e hidróxilos. En particular, las algas cafés contienen compuestos fenólicos denominados florotaninos, constituidos por floroglucinol y los derivados polimerizados del

mismo, cuya actividad antioxidante es semejante a la del α -tocoferol, de acuerdo a lo señalado por diversos autores.

Por otra parte, los estudios realizados con CLA generalmente han tenido como objetivo principal enriquecer el huevo con este ácido graso, en virtud de los múltiples beneficios que aporta a la salud. Sin embargo, el CLA posee otra importante función, actúa también como un potente antioxidante. Algunos autores señalan que es más potente que el α -tocoferol y aun más efectivo que el butil hidroxitolueno (BHT).

A la fecha no se han reportado estudios en aves que evalúen el efecto antioxidante de las algas marinas y del CLA en el huevo para plato enriquecido con AGn3, proveniente de gallinas cuya dieta haya sido suplementada con aceite de sardina. En cuanto a la vitamina E los resultados aun son contradictorios.

II. Revisión de la Literatura

2.1 Generalidades sobre el estado de la Salud Pública en México

De acuerdo a datos del Instituto Nacional de Estadística, Geografía e Informática (INEGI, 2010), las principales causas de mortalidad en México son la diabetes mellitus, las enfermedades cardiovasculares, accidentes cerebrovasculares y diferentes tipos de cáncer.

Asimismo, resultados publicados en la Encuesta Nacional de Salud y Nutrición, muestran que a nivel nacional ha habido un descenso en la desnutrición crónica, pero un incremento notable de sobrepeso y obesidad en todas las edades, regiones y grupos socioeconómicos, colocándose entre los problemas de salud pública más importantes del país. De hecho, México tiene en la actualidad una de las tasas más altas de sobrepeso y obesidad en el mundo (ENSANUT, 2012).

Sin embargo, se ha observado que incrementar la ingestión de AGn3 en la dieta es de gran utilidad en la prevención y control de las enfermedades antes citadas, así como, para reducir el sobrepeso y la obesidad (Chow, 2008; Simopoulos, 2008).

2.2 Generalidades sobre los ácidos grasos

Los ácidos grasos (AG) son cadenas hidrocarbonadas con un grupo carboxilo (COOH) en la parte terminal (también conocido como alfa), y un grupo metilo (CH₃) en el

extremo opuesto (conocido también como omega) (Figura 1). Raramente se encuentran libres en la naturaleza, más bien se encuentran en forma esterificada como componentes mayoritarios de diversos lípidos.

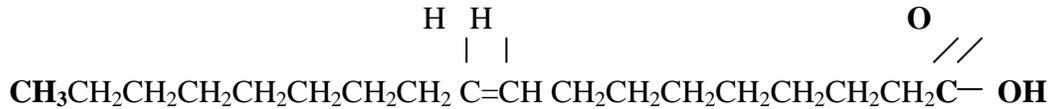


Figura 1. Estructura del ácido oleico (C18:1)

En las plantas superiores y en los animales, los AG predominantes son los de 16 y 18 átomos de carbono, como son los ácidos palmítico, esteárico, oleico y linoleico. Los AG con menos de 14 y más de 20 carbonos son raros, la mayor parte tienen un número par de átomos de carbono debido a que normalmente se biosintetizan por adición de unidades CH₂. Los AG con más de 20 carbonos generalmente están en algas y animales marinos (Lobb y Chow, 2008).

Clasificación de los ácidos grasos

De acuerdo a la **longitud de la cadena** se les puede clasificar en:

- Cadena corta (4-6 átomos de carbono)
- Cadena media (8 –12 átomos de carbono)
- Cadena larga (14 o más átomos de carbono)

De acuerdo a su **grado de insaturación** se pueden agrupar en:

- Saturados – no tienen dobles enlaces
- Monoinsaturados - cuentan con un solo doble enlace
- Poliinsaturados - tienen más de un doble enlace

Los ácidos grasos insaturados más comunes se muestran en el Cuadro 1. También se pueden clasificar en *cis* o *trans*. Los denominados *cis* cuentan con los dos hidrógenos del doble enlace en el mismo lado de la cadena; en cambio, los que son *trans* tienen los hidrógenos del doble enlace en lados opuestos de la cadena (Figura 2).

Cuadro 1. Ácidos grasos insaturados más comunes

Símbolo	Nombre común	Nombre sistemático	Estructura
Monoinsaturados			
16:1	Palmitoleico	cis-9-Hexadecenoico	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_5\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_7\text{COOH}$
18:1	Oleico	cis-9-Octadecenoico	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_7\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_7\text{COOH}$
18:1	Elaídico	trans-9-Octadecenoico	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_7\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_7\text{COOH}$
20:1	Gadoleico	cis-9-Eicosenoico	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_7\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_7\text{COOH}$
20:1	Gandoico	cis-11-Eicosenoico	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_7\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_9\text{COOH}$
22:1	Erúxico	cis-9-Docosenoico	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_7\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_9\text{COOH}$
Poliinsaturados omega 6			
18:2	Linoleico	cis-9,12- Octadecadienoico	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_4(\text{CH}=\text{CHCH}_2)_2(\text{CH}_2)_6\text{COOH}$
18:3	γ -Linolénico	cis-6,9,12- Octadecatrienoico	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_4(\text{CH}=\text{CHCH}_2)_3(\text{CH}_2)_3\text{COOH}$
20:4	Araquidónico	cis-5,8,11,14- Eicosatetraenoico	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_4(\text{CH}=\text{CHCH}_2)_4(\text{CH}_2)_2\text{COOH}$
22:5	Osmond	cis-4,7,10,13,16- Docosapentaenoico	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_4(\text{CH}=\text{CHCH}_2)_4(\text{CH}_2)_2\text{COOH}$
Poliinsaturados omega 3			
18:3	α -linolénico	cis-9,12,15,- Octadecatrienoico	$\text{CH}_3\text{CH}_2(\text{CH}=\text{CHCH}_2)_3(\text{CH}_2)_6\text{COOH}$
20:5	Timnódico	cis-5,8,11,14,17- Eicosapentaenoico	$\text{CH}_3\text{CH}_2(\text{CH}=\text{CHCH}_2)_5(\text{CH}_2)_2\text{COOH}$
22:5	Osmond	cis-7,10,13,16,19- Docosapentaenoico	$\text{CH}_3\text{CH}_2(\text{CH}=\text{CHCH}_2)_5(\text{CH}_2)_2\text{COOH}$
22:6	Cervónico	cis-4,7,10,13,16,19- Docosaheptaenoico	$\text{CH}_3\text{CH}_2(\text{CH}=\text{CHCH}_2)_6(\text{CH}_2)\text{COOH}$

Fuente: Dupont (1999), Mataix y Gil (2004), Lobb y Chow (2008)

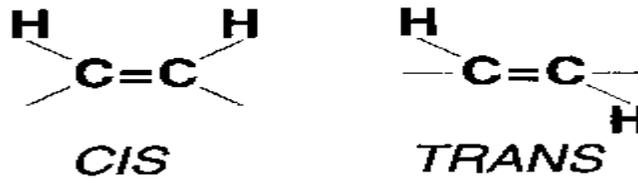


Figura 2. Configuración *cis* o *trans* de un ácido graso

La posición del doble enlace puede servir también para clasificar a los AG, pues este doble enlace puede dar origen a diferentes configuraciones geométricas, y por ello diferentes isómeros de un ácido graso, como es el caso del ácido linoleico que tiene diferentes isómeros (Figura 3).



Figura 3. Estructura del ácido linoleico y de sus isómeros *c*9,*t*11 y *t*10,*c*12

Fuente: Modificada de Bauman et al. (1999).

En los ácidos grasos poliinsaturados (AGPI), los dobles enlaces tienden a encontrarse a cada tercer átomo de carbono a partir del metilo terminal (CH₃) de la molécula. Los dobles enlaces de los AG insaturados tienen casi siempre la configuración *cis* (Chow, 2008) (Figura 4).

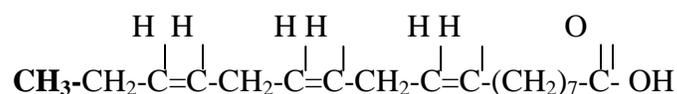


Figura 4. Estructura del ácido α -linolénico (C18:3)

Nomenclatura

La posición del primer enlace insaturado desde el metilo al carbono final de la cadena es especificado por una “n” o una “ ω ”, la última letra corresponde al alfabeto griego. Por ejemplo, C18:3 n3 es el ácido α -linolénico (Figura 4), el 18 corresponde al número de carbonos de la cadena, el 3 corresponde al número de insaturaciones, y el otro 3 indica el lugar donde se encuentra la primera insaturación con respecto al metilo terminal de la cadena, es decir a tres átomos de carbono a partir del grupo metilo (Huang y Liu,1999). De acuerdo a esta característica, los ácidos grasos insaturados se dividen en cuatro grandes familias n9, n7, n6 y n3. Mediante procesos de desaturación y elongación, los principales AG de las dos últimas familias pueden dar lugar a otros AG de cadena mas larga (Figura 5).

A su vez, algunos de ellos pueden dar origen a sustancias conocidas como eicosanoides los cuales comprenden: prostaglandinas (PG), tromboxanos (TX) y leucotrienos (LT). Por ejemplo, el ácido oleico (C18:1 n9) puede ser convertido a ácido eicosatrienoico (C20:3 n9), sin embargo este AG no sirve como sustrato para la ciclooxigenasa (COX), pero sí para la 5-lipooxigenasa (5-LOX). Por lo tanto, a partir de C20:3 n9 se pueden formar leucotrienos de la serie 3(LT₃), pero no PG. El ácido linoleico (C18:2 n6 LA) puede ser desaturado y elongado a ácido araquidónico (C20:4 n6 AA), y este a su vez puede dar lugar a la formación de PG y TX de la serie 2, así como a LT de la serie 4 (Figura 6). El EPA, a través de la vía de la COX y la LOX puede ser metabolizado para formar PG y TX de la serie 3 y LT de la serie 5, que son metabolitos menos activos que los producidos por los n6 (Figura 7) (Lee y Huang, 2008).

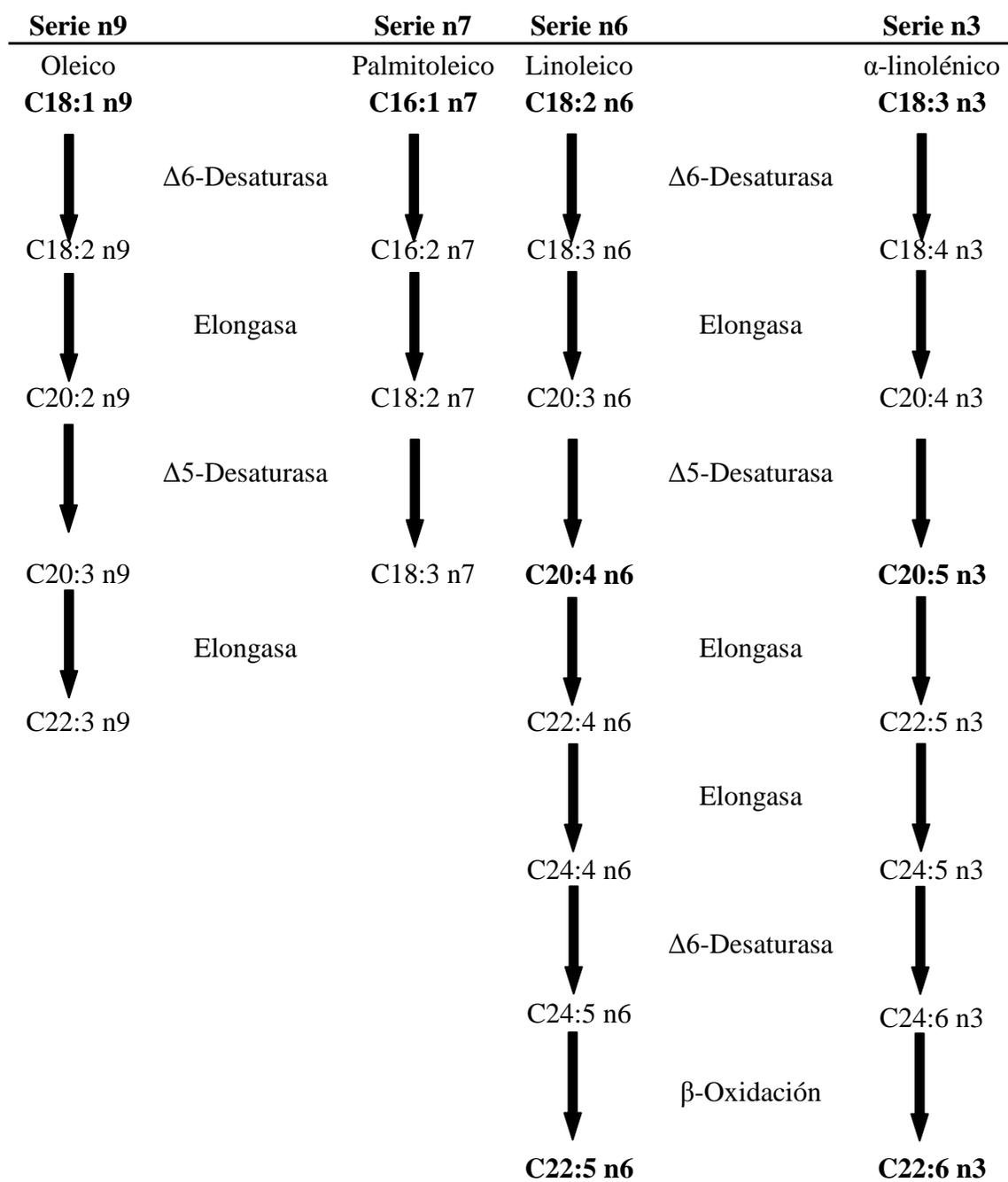


Figura 5. Ruta metabólica de las principales familias de ácidos grasos insaturados

Fuente: Adaptado de Vemuri y Kelley (2008).

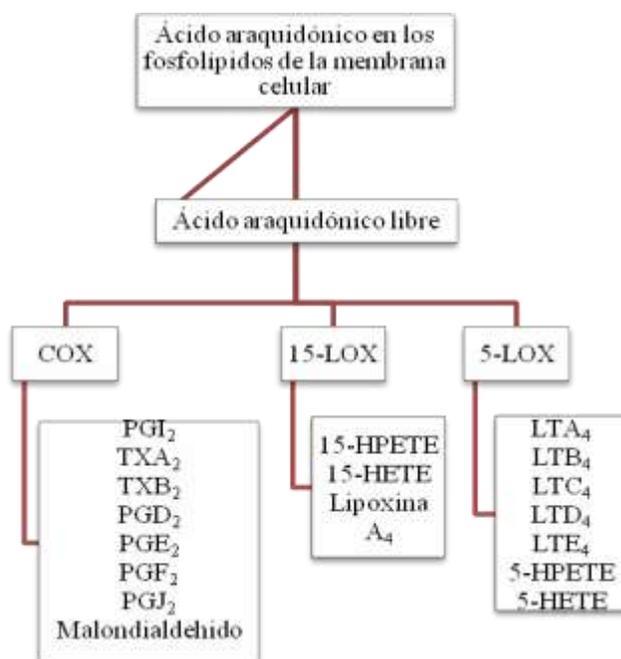


Figura 6. Síntesis de eicosanoides a partir del ácido araquidónico
 COX, ciclooxigenasa; HETE, ácido hidroxieicosatetraenoico; HPETE, ácido hidroperoxieicosatetraenoico; LOX, lipooxigenasa; LT, leucotrieno; PG, prostanglandina; TX, tromboxano. Adaptada de Lee y Huang (2008).

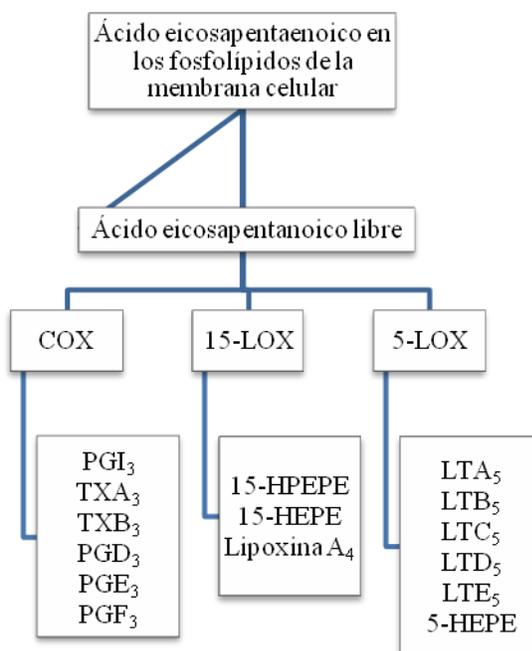


Figura 7. Formación de eicosanoides a partir del ácido eicosapentaenoico
 COX, ciclooxigenasa; HETE, ácido hidroxieicosatetraenoico; HPETE, ácido hidroperoxieicosatetraenoico; LOX, lipooxigenasa; LT, leucotrieno; PG, prostanglandina; TX, tromboxano. Adaptada de Lee y Huang (2008).

En particular, los AGPI de la familia n3 (AGn3) revisten un especial interés en este estudio por los numerosos beneficios que aportan a la salud y que más adelante se mencionarán. Los principales representantes de esta familia son el ácido α -linolénico (C18:3 ALA), el ácido eicosapentaenoico (C20:5 EPA), el docosapentaenoico (C22:5 DPA) y el ácido docosahexaenoico (C22:6 DHA). Aunque el ALA puede ser convertido a AG de cadena mas larga como el EPA (C20:5 n3) y DHA (C22:6 n3), mediante las mismas enzimas desaturadas utilizadas por los AGn6 y n9, sus efectos biológicos no son equivalentes. De hecho, aunque los tres son importantes, el ALA no es tan eficiente como el EPA y el DHA en promover los beneficios a la salud. Estos dos últimos son más rápidamente incorporados en el plasma y lípidos de la membrana y sus efectos son más rápidos que los del ALA (Simopoulos 2000, 2008).

Beneficios de los ácidos grasos omega 3 (EPA y DHA)

Los resultados de varios estudios epidemiológicos en humanos y animales demuestran que los AGn3 ofrecen numerosos beneficios a la salud (Stak, 2000; Goodfellow, 2000; Kris-Etherton et al. 2002; Helland et al. 2003; Chow, 2008; Simopoulos, 2008; Ramsden et al. 2011):

- Reducen el riesgo de padecer enfermedades cardiovasculares debido a una menor formación de coágulos o agregados plaquetarios.
- Reducen los niveles de colesterol y triglicéridos en sangre.
- Reducen la presión sanguínea.
- Reducen el riesgo de padecer ciertos tipos de cáncer.
- Son esenciales en el desarrollo del cerebro y de la retina.
- Fortalecen el sistema inmunológico.
- Útiles en la prevención y manejo de la hiperinsulinemia y diabetes tipo 2.
- Aumentan el coeficiente intelectual (IQ) en infantes, cuando las madres consumen AGn3 durante la gestación y lactación.
- Tienen un efecto positivo en niños con problemas de déficit de atención.
- Reducen el dolor de cabeza crónico y migraña.

Fuentes de ácidos grasos omega 3 (EPA y DHA)

Los productos marinos (peces, crustáceos, microalgas marinas, etc.) constituyen la principal fuente de EPA y del DHA (Cuadro 2). Aunque hay alguna evidencia de que los peces pueden convertir los ácidos grasos de cadena corta en AGn3, se acepta que la mayor parte provienen de las algas microscópicas y de crustáceos planctónicos, que son la base de la cadena alimentaria. El EPA es capaz de ser transformado en sustancias biológicamente activas, conocidas como eicosanoides (prostaglandinas, leucotrienos y tromboxanos). El DHA no es capaz de ser metabolizado a eicosanoides, pero el aspecto mas importante es su papel como componente estructural en las membranas del sistema nervioso y de la retina, pudiendo constituir hasta el 60% de los AGPI en estas membranas (Rice, 1999). La ingesta diaria recomendada de EPA+DHA es de 0.650-1.0 g/d (Simopoulos, 2000; Kris-Etherton et al. 2002).

Cuadro 2. Contenido de ácidos grasos omega 3 en algunas especies de pescado, crustáceos y moluscos comestibles (g/100g de porción comestible)

Producto	Lípidos Totales	EPA C20:5	DPA C22:5	DHA C22:6	Total n3
Mantaraya	0.4	0	0	0.1	0.1
Ostión	1.3	0.2	tr	0.2	0.5
Calamar	1.7	0.1	tr	0.3	0.5
Langosta	1.6	0.2	tr	0.1	0.3
Cangrejo	5.5	0.5	0.1	0.5	1.2
Mejillón	1.8	0.3	tr	0.1	0.5
Camarón cocido	2.4	0.4	tr	0.3	0.8
Arenque	13.2	0.8	0.1	1	2
Macarela	16.1	0.7	0.1	1.1	2
Sardina	9.2	0.9	0.1	1.1	2.2
Atún	4.6	0.3	0.1	1.1	1.6
Salmón	11	0.5	0.4	1.3	2.3
Trucha arcoíris	5.2	0.2	0.1	0.8	1.2
Aceite de hígado de bacalao	100.0	9.0	1.0	9.0	20

Fuente: Rice (1999), tr = trazas

EPA - ácido eicosapentaenoico, DPA - ácido docosapentaenoico, DHA - ácido docosahexaenoico.

Sin embargo, el consumo de productos marinos en México es muy bajo (10.4 kg *per capita* anual), tal como lo informa la Comisión Nacional de Pesca (CONAPESCA, 2010).

Por lo tanto, se ha considerado que el huevo puede ser un excelente vehículo para hacer llegar a un mayor número de personas los beneficios de los AGn3, ya que entre otras ventajas tiene un bajo precio, versatilidad y propiedades funcionales que lo hacen un excelente ingrediente en la industria alimentaria.

2.3 Generalidades sobre el Huevo

Producción y consumo de huevo en México

A nivel mundial, México es el primer país consumidor de huevo fresco y el sexto como productor. El consumo promedio anual es de 22.8 kg por habitante, superando a otros países asiáticos como China, Singapur y Japón. Esta industria es también una importante fuente de empleos; en el 2005 generó 1,070,000 empleos y en 2011 fueron 1,158,000. El crecimiento de esta industria ha permitido que el país sea autosuficiente en la producción de este alimento (UNA, 2012).

La producción nacional diaria de huevo es superior a las 250,000 cajas, de las cuales: más del 80% se comercializa a granel a través de mercados tradicionales, 14% se comercializa en tiendas de autoservicio y 6% se industrializa.

En cuanto al huevo industrializado, México cuenta con 10 plantas deshidratadoras de huevo, de las cuales 6 son propiedad de avicultores y se encuentran en el estado de Jalisco y norte del país. La Asociación Nacional de Procesadores de Huevo (ANAPH) cuenta con 4 plantas procesadoras (UNA, 2012).

Respecto a la importación de ovoproductos deshidratados, ésta disminuyó un 21% en 2010, en comparación con 2009; mientras que los productos líquidos aumentaron en un 2%. Sin embargo, es importante señalar que en este rubro México está manifestando un notable crecimiento en los últimos años debido a la apertura de nuevos mercados. De hecho, de las exportaciones de productos avícolas, la mayor parte correspondió a productos con valor agregado (35.6%) y ovoproductos (33.1%) (UNA, 2012).

Formación y Estructura del huevo

El aparato reproductor de las gallinas consta de ovarios y oviducto, pero solo el ovario izquierdo se desarrolla. En él se forma la yema a partir de un óvulo rodeado por la

pared folicular, cubierto por una membrana vitelina y en la parte central el disco germinal (que es el lugar de división de las células embrionarias cuando el huevo está fecundado) que al dirigirse hacia la superficie del óvulo deja un rastro o huella, llamado latebra (Burke, 1999; Johnson, 2000).

Unos 10 días antes de la ovulación, en el folículo tiene lugar el depósito de sustancias lipoproteicas (además de minerales y pigmentos) que constituyen el vitelo. Ninguna de estas sustancias es sintetizada por el ovario, todas se sintetizan en el hígado y por vía sanguínea llegan al folículo (Burke, 1999; Johnson, 2000).

Aproximadamente a las 20 semanas de edad, la gallina alcanza la madurez sexual y empieza a ovular. La ruptura del folículo se produce a nivel del estigma, que es la parte de la pared folicular exenta de capilares sanguíneos. El folículo ya maduro libera a la yema que es captada en la bolsa ovárica del infundíbulo. En este segmento, la yema permanece aproximadamente de 15 a 20 min y ahí le son agregadas las chalazas y dos capas externas, adicionales a la membrana vitelina (que en realidad es doble) que ya tiene. Las cuatro funcionan como unidad única y normalmente se consideran como la membrana de la yema aunque las tres capas más externas están realmente cubriendo la membrana vitelina (Figura 8). Estas capas juegan un papel muy importante en la protección de la yema, evitando la entrada de agua a partir de la clara (Burke, 1999; Johnson, 2000).

Posteriormente pasa al magnum donde es secretada una solución acuosa de proteínas y minerales (albumen), permaneciendo en el sitio por un periodo aproximado de 3:30 horas. A diferencia de las proteínas de la yema que son sintetizadas en el hígado, las proteínas del albumen son sintetizadas en las células epiteliales y tubulares de la pared del magnum. Cuando el huevo sale de este segmento, el albumen presenta un aspecto arrugado o gelatinoso denso ya que solo contiene 50% del agua. El proceso de hidratación termina en el útero.

En el istmo dura poco tiempo (60-75 min) y ahí las membranas testáceas y la mamilar son formadas.

Es en la glándula coquiliaria o útero donde permanece por más tiempo (20 horas) aquí se completa la hidratación. A este periodo se le conoce como “plumping” porque concluye con una hidratación del huevo y un tensado de las membranas de la cáscara. La

adición de agua va acompañada por una secreción de minerales (sodio, potasio y bicarbonato) y porfirinas (pigmentación del cascarón). Se produce una rotación del huevo, dando lugar a la torsión de las fibras proteicas del albumen denso, formandose las chalazas. El huevo se encuentra en una solución sobresaturada de carbonato cálcico que se va depositando, alrededor y sobre las fibras que constituyen la membrana testácea externa en núcleos o conos concretos. Esta capa cristalina basal y los cristales que irradian, constituyen los cuerpos mamilares, que crecen y se fusionan formando la capa mamilar. Durante este proceso se van definiendo los poros que atravesarán la cáscara. A partir de aquí, continua una fase de calcificación rápida dando lugar a la capa en empalizada y, posteriormente se produce un cambio de orientación de los cristales formandóse la capa de cristales verticales. Las porfirinas (responsables de la coloración de la yema) se depositan las dos últimas horas de la formación del huevo y depende de la estirpe.

Una vez formada la cáscara, es recubierta por último con una cutícula que cubre los poros, reduciendo la pérdida de humedad y el riesgo de contaminación bacteriana.

Una vez formado el huevo, se produce la expulsión a través de la vagina y hasta la cloaca, gracias a las contracciones de la musculatura lisa que rodea a la mucosa del útero (Burke, 1999; Johnson, 2000). La estructura final del huevo se muestra en la Figura 8.

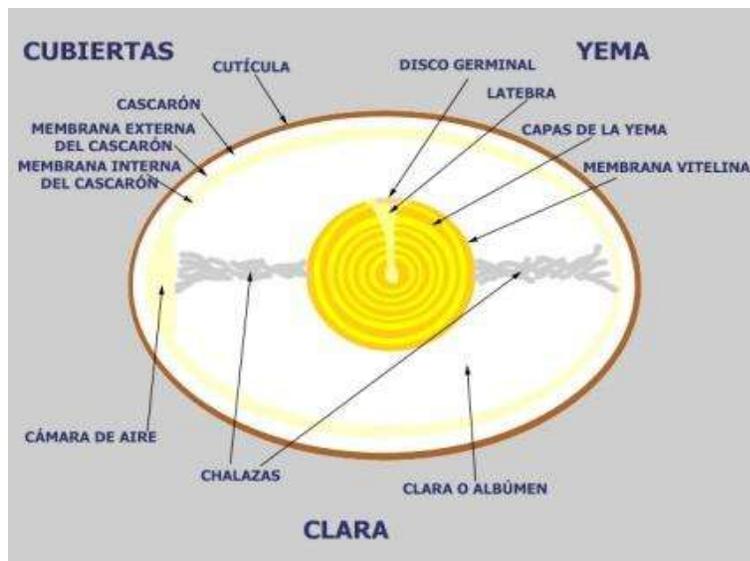


Figura 8. Estructura del huevo de gallina

Fuente: www.huevo.org.es

Componentes del huevo

El cascarón es la primera barrera de defensa que posee el huevo y constituye entre el 9% y el 12% del peso total del huevo. Está constituido por carbonato de calcio (94%) como componente estructural, con pequeñas cantidades de carbonato de magnesio, fosfato de calcio y otros materiales orgánicos (Zeidler, 2002).

En el caso de la albúmina, sus constituyentes son 88% agua, 11% proteínas, 1% carbohidratos y 0.5% minerales. Básicamente se trata de una solución de proteínas globulares que contiene fibras de ovomucina (existen más de treinta proteínas diferentes). Son ricas en aminoácidos esenciales. Tres de sus glucoproteínas (ovoalbúmina, conalbúmina, ovomucoide) suman más del 80% del total de proteínas en la clara de huevo. El resto está conformado por otras proteínas como ovoglobulinas, ovomucina, lisozima, avidina, cistatina, etc. Es importante señalar que a la conalbúmina u ovotransferrina se le han reconocido propiedades antioxidantes. Algunos de los carbohidratos presentes en la albúmina son glucosa libre y glicoproteínas las cuales contienen manosa y galactosa (Zeidler, 2002; Guérin-Dubiard et al. 2007).

En el caso de la yema, sus principales componentes son agua (47.5%), lípidos (33%) y proteínas (17.4%). Todo el material lipídico del huevo está presente en la yema en la forma de triglicéridos, fosfolípidos y esteroides (Cuadro 3). Los triglicéridos son ésteres de ácidos grasos unidos a una molécula de glicerol y son la principal forma de almacenamiento de energía. Los fosfolípidos constituyen 23 a 24% del total de lípidos en la yema, también poseen ácidos grasos y proporcionan la mayor parte de la capacidad emulsificante de la yema; la lecitina y la cefalina son los principales fosfolípidos en la yema. El principal esteroide en el huevo es el colesterol. En la yema también están presentes pigmentos como la luteína, zeaxantina, b-caroteno; así como vitaminas y minerales (Zeidler, 2002a). La fosvitina es una de las principales proteínas presentes en la yema, contiene 3-10% de fósforo y 6% de carbohidratos y se le han reconocido propiedades antibacteriales, emulsificantes y antioxidantes (Guérin-Dubiard et al. 2007).

Cuadro 3. Composición de la yema de huevo

Constituyente	% del peso
Agua	47.5
Lípidos	33.0
Proteína	17.4
Carbohidratos libres	0.2
Elementos inorgánicos	1.1
Otros	0.8
Total 100.0	

Composición de los lípidos de la yema (% total de lípidos)

Triglicéridos	71 a 73
Fosfolípidos	23 a 24
Colesterol y otros esteroides	4 a 6

Composición de los triglicéridos

Acidos grasos saturados	44.0
Acidos grasos monoinsaturados	44.0
Acidos grasos poliinsaturados	12.0

Principales fosfolípidos (% del total de fosfolípidos)

Lecitina	70 a 77
Cefalina	18 a 24

Composición de los esteroides (% del total de lípidos)

Colesterol	3.52
Esteres de Colesterol	0.39

Macromoléculas y complejos (% del total del peso del huevo)

Lipoproteínas de baja densidad	30
Granulos	12
Livetinas	8

Fuente: Zeidler (2002).

Valor nutritivo del huevo

El huevo posee una enorme riqueza en nutrimentos esenciales. Un huevo grande (60 g) provee aproximadamente 6 g de proteína, de ésta, la mitad se encuentra en el albumen. La proteína es de excelente calidad, es usada como proteína de referencia porque contiene todos los aminoácidos esenciales para el humano, en las proporciones adecuadas. Su valor energético es muy bajo (75 kcal/pieza). La mayoría de los nutrimentos del huevo, se encuentran en la yema. Es excelente fuente de casi todos los minerales, excepto del calcio, el cual existe en muy bajas concentraciones. Contiene importantes cantidades de fósforo (89 mg), hierro (0.72 mg), zinc (0.5 mg) y selenio (Turnbull, 1999; Meister, 2002; Anton, 2007).

Contiene todas las vitaminas, excepto el ácido ascórbico. Es una excelente fuente de Vitamina D (24 UI), de hecho ocupa el segundo lugar como tal, después del aceite de pescado, siendo por ello de gran valor en aquellos individuos que no reciben luz solar en cantidad suficiente. Es también una excelente fuente de riboflavina (0.254 mg). La vitamina A (retinol) se encuentra en cantidades significativas en la yema de huevo (317 UI). Lo mismo que la vitamina E (0.7 mg). El huevo también se distingue por tener una cantidad considerable de lecitina (fosfolípido), ácido fólico (23 mcg) y colina (280 mg)(Turnbull, 1999; Meister, 2002; Anton, 2007).

Aunado a esto, la presencia de pigmentos en la yema, como la luteína (150-250 mcg) y la zeaxantina (200 mcg), ha contribuido a que se considere al huevo como un alimento funcional, ya que estos carotenoides han resultado ser una protección contra las cataratas y la degeneración macular de la retina (Meister, 2002; Goodrow et al. 2006; Anton, 2007).

Por lo que respecta al contenido de ácidos grasos que habitualmente tiene un huevo, se puede decir que los principales ácidos grasos saturados presentes en el mismo son, el palmítico (C16:0) y el esteárico (C18:0); de los monoinsaturados es el oleico (C18:1 n-9), mientras que de los poliinsaturados es el LA (C18:2 n6) (Cuadro 4).

El contenido de AGn3 en el huevo es de aproximadamente 126 mg/100 de huevo completo (Makrides et al. 2002), sin embargo, esta cantidad puede incrementarse

incorporando en la dieta de las aves ingredientes con un alto contenido de estos compuestos, como es el caso de la linaza, la canola, la harina de crustáceos, así como la harina y aceite de pescado. Esto es posible, ya que el metabolismo de los lípidos en las aves así lo permite.

Cuadro 4. Ácidos grasos presentes en el huevo de gallina (g/100g)

Acido graso	Huevo entero	Yema	Clara
Saturados	4.4	13.0	-
Palmítico(C16:0)	2.5	7.3	-
Esteárico(C18:0)	0.86	2.5	-
Monoinsaturados	4.5	13.1	-
Palmitoleico (C16:1)	0.4	1.1	-
Oleico (C18:1)	4.1	12.0	-
Poliinsaturados	1.64	4.72	-
Linoleico (C18:2 LA n6)	1.25	3.6	-
α -linolénico(C18:3 ALA n3)	0.04	0.12	-
Araquidónico(C20:4 AA n6)	0.2	0.6	-
Eicosapentaenoico (C20:5 EPA n3)	0.00	0.00	-
Docosahexanoico(C22:6 DHA n3)	0.15	0.40	-

Fuente: Seuss-Baum (2007)

2.4 Digestión, absorción y metabolismo de los lípidos en las aves

Digestión de los lípidos

Para permitir la acción de las enzimas pancreáticas y la formación de micelas en el contenido acuoso del intestino, la grasa ingerida debe ser emulsionada en el estómago. Entre las sustancias emulsificantes que favorecen este proceso se encuentran los monoglicéridos obtenidos de la hidrólisis gástrica de las grasas, mediada por la lipasa gástrica, que hidroliza hasta un 30% de los lípidos de la dieta en mamíferos (Place, 1996).

Al contrario de lo que ocurre en los mamíferos, las aves presentan muy baja actividad lipolítica en el estómago, por lo que la óptima emulsión de las grasas para la posterior formación de micelas y absorción de lípidos a nivel intestinal, al parecer se debe a la existencia del reflejo entero-gástrico. Mediante este mecanismo, parte de los triglicéridos hidrolizados en el duodeno vuelven nuevamente a la molleja acompañados por parte de las sales biliares, donde intervendrán en la correcta emulsión de la grasa (Place, 1996).

La grasa emulsionada está formada por pequeños agregados esféricos de 200 a 5000 nm de diámetro, constituidos por lípidos polares (fosfolípidos, glicolípidos y monoglicéridos). Gracias a la característica anfóterica de éstos lípidos, se pueden situar formando una monocapa en la interfase óleo-acuosa, dirigiendo su extremo polar hacia el agua y su extremo apolar hacia el resto de sustancias lipídicas (Nelson y Cox, 2004).

Las sales biliares entran en contacto con la grasa emulsionada disolviendo algunos de sus constituyentes y proporcionándole carga negativa. Es de vital importancia que las sales biliares se mantengan en solución a los niveles de pH que se dan en la molleja. Para ello se forman conjugados de las sales biliares con la taurina que permite su disolución incluso a niveles de pH inferiores a 1 (Nelson y Cox, 2004).

En el duodeno, la carga negativa proporcionada por las sales biliares atrae a la colipasa cuya función es la de mantener a la lipasa pancreática cerca del glóbulo de grasa para permitir su acción. La lipasa pancreática hidroliza preferentemente los AG situados en los carbonos 1 y 3 del TG, dando lugar a 2-monoacilgliceroles y ácidos grasos libres, con carácter más polar, formándose así partículas más pequeñas denominadas micelas cuyo diámetro aproximado es de 3-10 nm (Bohinski, 1991).

Otras enzimas pancreáticas involucradas en la digestión de lípidos son las fosfolipasas A1 y A2 y la carboxil-ester-hidrolasa. Dichas enzimas catalizan la hidrólisis de los fosfolípidos (dando AG libres y lisofosfolípidos) y diferentes ésteres de AG, como los de colesterol. Los derivados lipídicos más polares pasan a la fase acuosa del intestino y entran a formar parte de las micelas, junto con las sales biliares, englobando a otros lípidos no polares. El carácter hidrofílico de las micelas les permite atravesar la capa acuosa adyacente a la membrana celular y entrar en contacto con la membrana del enterocito para absorción de los lípidos (Murray et al., 2004).

Absorción de lípidos

Existen diferentes factores que determinan el grado de absorción de las grasas (Wiseman et al., 1991; Crespo y Esteve, 2001):

Ácidos grasos libres y monoglicéridos: tras la hidrólisis de los TG se liberan AG libres (AGL) y monoglicéridos. Gracias a los 2 grupos hidroxilo de los monoglicéridos su grado de polaridad es mayor que el de los AG libres, lo cual favorece su absorción.

Grado de insaturación: Las proteínas transportadoras de ácidos grasos (FABP: Fatty Acid Binding Protein) tienen mayor afinidad por los AG poliinsaturados (AGPI) y éstos, además, tienen más capacidad para formar las micelas, por lo que su grado de absorción es mayor respecto a los AG saturados (AGS).

Longitud de cadena: A menor longitud de cadena del ácido graso mayor polaridad con relación al tamaño de la molécula, y por tanto, mayor capacidad de interacción con el medio acuoso. De hecho, los ácidos grasos de cadena media y corta no necesitan proteínas transportadoras citosólicas (FABP) ni las lipoproteínas plasmáticas, ya que son transportados unidos a la albúmina.

Interacciones: La combinación de AGPI y AGS mejora la absorción de los últimos. La mayor facilidad de los AGPI para formar micelas mejora también la incorporación de los AGS a éstas, facilitando su absorción. Tal es dicho sinergismo que se han establecido ecuaciones exponenciales que relacionan el grado de insaturación con la digestibilidad y el contenido en energía metabolizable de la dieta.

Dentro de la célula intestinal se vuelven a formar los triglicéridos, fosfolípidos y ésteres de colesterol que serán integrados en los portomicrones (PM) para su paso a la circulación portal. Se ha de mencionar, que en el caso de las aves, la reesterificación de los ácidos grasos absorbidos no es total y hasta un 50% pueden pasar directamente a la sangre y ser transportados por la albúmina (Griffin y Whitehead, 1982).

La yema contiene en promedio 6 g de lípidos, principalmente en la forma de triacilgliceroles, fosfolípidos y colesterol libre. Componentes menores incluyen ésteres de colesterol y ácidos grasos libres. En los fosfolípidos se encuentran los AGPI. Los AG destinados a la yema se sintetizan en el hígado del ave. La composición lipídica de la yema es el resultado de una combinación de la lipogénesis *de novo* y la incorporación de

componentes lipídicos presentes en la dieta. Antes de la absorción intestinal, los productos hidrolizados de la digestión lipídica, incluyendo los AGM y AGPI deben ser re-esterificados dentro del retículo endoplásmico de los enterocitos antes de ser transportados. Los triglicéridos resultantes son empacados con colesterol, fosfolípidos y proteínas para formar lipoproteínas.

Metabolismo de los lípidos

Las lipoproteínas (LP) son complejos proteo-lipídicos que permiten el transporte de lípidos a través de la sangre. Están compuestos por un núcleo hidrofóbico (lípidos no polares) y una capa externa de lípidos polares y apoproteínas (Motta et al., 1996).

En el humano estas LP son transportadas por el sistema linfático, en las aves lo son a través de los portomicrones, debido a que son transferidos a la circulación portal (Yannokopoulos, 2007).

En pollos se han identificado cinco tipos de lipoproteínas según su contenido en triglicéridos y su densidad, los portomicrones (PM), lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL), lipoproteínas de densidad intermedia (IDL), lipoproteínas de baja densidad (LDL) y lipoproteínas de alta densidad (HDL) (Griffin y Whitehead, 1982).

A diferencia de los quilomicrones (QM) de mamíferos, los portomicrones pasan a la circulación portal, por lo que son dirigidos directamente al hígado. Sin embargo, al igual que en los mamíferos, la captación por parte del hígado no sucede hasta después de ser parcialmente metabolizados en los tejidos extrahepáticos, con un tiempo medio de circulación de 3-4 minutos (Griffin y Whitehead, 1982).

Los portomicrones circulantes son sustrato de la enzima lipoproteinlipasa (LPL). En este proceso se produce la hidrólisis de los triglicéridos y parte de los fosfolípidos, liberándose ácidos grasos que serán captados por los tejidos o transportados por el plasma unidos a la albúmina. El resto de fosfolípidos de los portomicrones junto con las Apo C, serán transferidos a las lipoproteínas de alta densidad (HDL por sus siglas en inglés), quedando un portomicrón remanente rico en ésteres de colesterol que será captado por el tejido hepático (con receptores para la Apo B) (Griffin y Whitehead, 1982).

Las VLDL son sintetizadas en el hígado y liberadas a la circulación conteniendo triglicéridos, colesterol, fosfolípidos y las correspondientes apoproteínas. Como es bien sabido, en el pollo, el hígado es el principal sitio de síntesis de ácidos grasos, por lo que la deposición corporal de grasa dependerá en gran medida de la secreción y los niveles plasmáticos de VLDL (Fisher, 1984).

En cuanto a la secreción de VLDL, son menos conocidos los factores que regulan este proceso, sin embargo, parece ser que la enzima δ -9-desaturasa juega un papel importante. El mecanismo mediante el cual esta enzima favorece la secreción de VLDL no está muy claro, algunas hipótesis sugieren que la enzima δ -9 desaturasa incorpora un doble enlace en el carbono 9 de los ácidos grasos, formando ácido oleico y palmitoleico a partir del esteárico y palmítico, respectivamente (Figura 9). La introducción de éste doble enlace produce una disminución en el punto de fusión del ácido graso, lo cual favorecería su incorporación a las lipoproteínas (Legrand et al., 1997).

Por otro lado, también existe la posibilidad de que el ácido oleico impida la degradación intracelular de Apo B, apoproteína necesaria para la síntesis de VLDL (Dixon et al., 1991).

Al igual que los portomicrones, las VLDL son sustrato de la LPL. Una vez hidrolizados los TG, parte del colesterol, fosfolípidos y Apo-C son transferidos a las HDL. Las VLDL hidrolizadas pasan a formar las lipoproteínas de densidad intermedia (IDL) y las LDL, con mayor densidad que las VLDL debido a su mayor contenido proteico (Crespo y Esteve, 2001).

Las IDL presentan mayor contenido en colesterol y ésteres de colesterol. Por su carencia en Apo-C, dejan de ser sustrato de la LPL, pudiendo ser captadas por el hígado o metabolizadas a LDL. La conversión de IDL a LDL parece ser mediada, al menos en mamíferos, por la lipasa hepática (LH), más que por la LPL (Welch y Borlak, 2008); aunque parece ser que dicha enzima presenta una actividad inferior en las aves, en el proceso vuelven a hidrolizarse triglicéridos y fosfolípidos, quedando una partícula muy rica en colesterol (Griffin y Whitehead, 1982).

Las LDL pueden ser captadas por una gran variedad de tejidos, constituyendo una importante fuente de colesterol para la integridad de la membrana celular y la síntesis de

hormonas esteroideas. La retirada de las IDL y LDL de la circulación es realizada por endocitos, mediada por un receptor y posterior degradación en los lisosomas (Griffin y Whitehead, 1982).

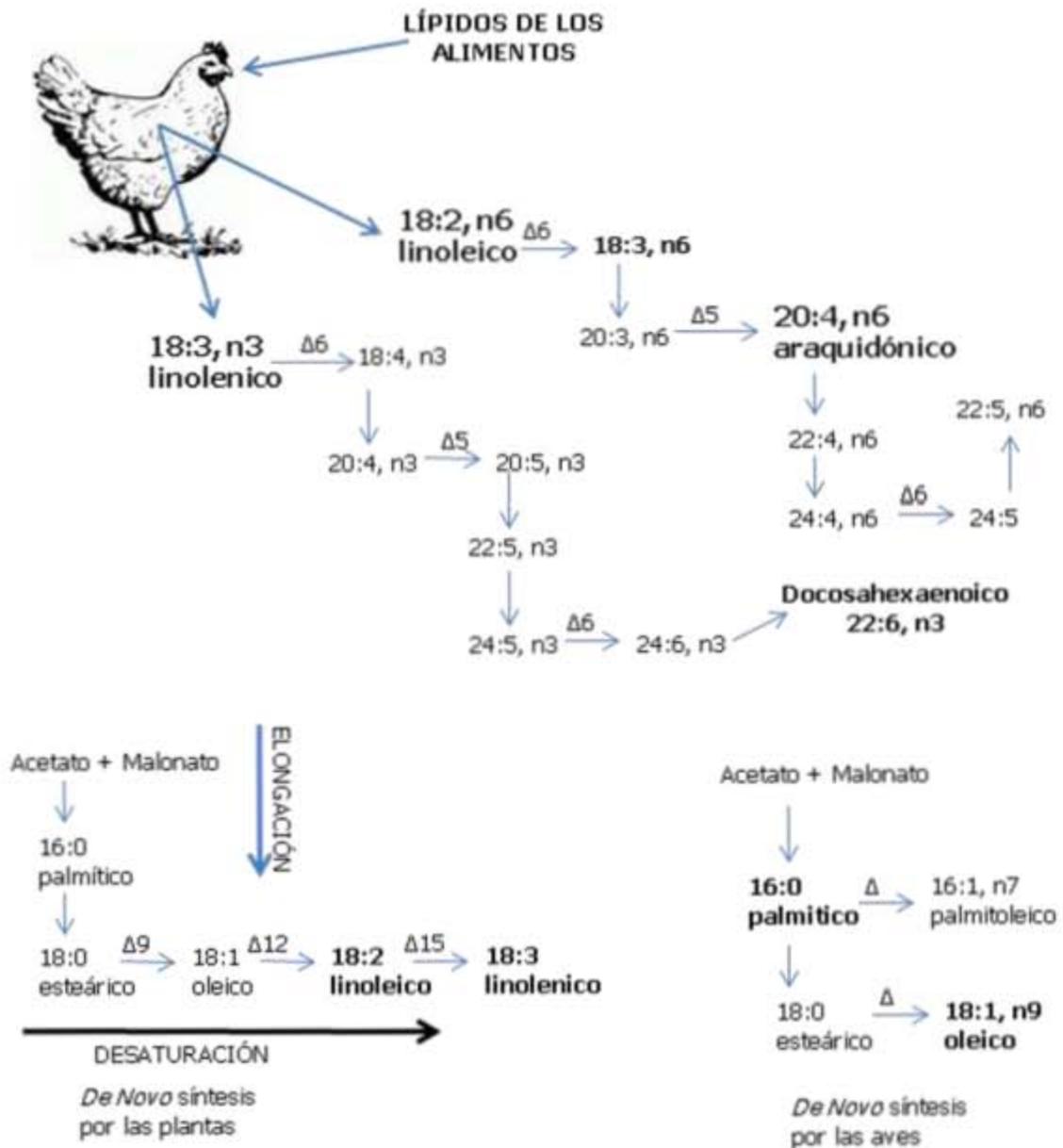


Figura 9. Ruta metabólica de los ácidos grasos en el ave
Fuente: Klasing (1998).

Las HDL pueden ser sintetizadas por el hígado o ser producto de la hidrólisis de lipoproteínas ricas en triglicéridos. Actúan como vehículo de transporte del colesterol, tanto a los tejidos periféricos como hacia el hígado (transporte inverso de colesterol) (Crespo y Esteve, 2001).

En mamíferos, además, juegan un importante papel en el metabolismo de los QM y VLDL, ya que les transfieren las Apo C y E, y captan el colesterol y fosfolípidos tras la hidrólisis de estas lipoproteínas. En mamíferos, las HDL son el principal sustrato de la lecitín-colesterol acil-transferasa (LCAT) activada por la Apo-AI la cual esterifica el colesterol con la lecitina haciéndola pasar al centro de la lipoproteína (parte hidrofóbica) y permitiendo proseguir su captación. En aves, la Apo-AI está también presente en las VLDL, IDL y LDL, por lo que todas estas lipoproteínas son sustrato para la esterificación del colesterol (Griffin y Whitehead, 1982).

Por otro lado, los AG de cadena corta son transportados como tales en las aves (también al hígado vía sistema porta) (Yannokopoulos, 2007).

Por lo tanto, el metabolismo de lípidos en aves permite incrementar el contenido de AGn3 en el huevo al incorporar en la dieta ingredientes con un alto contenido de estos compuestos nutraceuticos.

2.5 Ingredientes utilizados para incrementar el contenido de AGn3 en el huevo

Algunos de los ingredientes que se han utilizado para incrementar el contenido de AGn3 en el huevo son: el aceite y harina de linaza, aceite de canola, aceite de menhaden, aceite de atún, aceite de sardina, microalgas marinas, harina de langostilla, etc (González-Esquerri y Lesson, 2000, 2001; Carranco et al., 2003; Castillo-Badillo et al. 2005; Carrillo et al. 2005, 2008). La linaza y la canola son excelente fuente del ácido α -linolénico (ALA), sin embargo, como se mencionó antes, este ácido no es tan eficiente como el EPA y DHA en brindar los beneficios a la salud, y aunque el ALA puede convertirse en EPA y DHA, este proceso en el humano es muy lento (González-Esquerri y Leeson, 2001).

Por tal motivo, y con la finalidad de producir huevos con un alto contenido de EPA y DHA, los aceites (principalmente de menhaden, atún y sardina), harinas de pescado

(principalmente de anchoveta), así como microalgas marinas con un alto contenido de DHA (DHA Gold™), han sido frecuentemente empleados en la alimentación de las aves, ya que poseen altas concentraciones de estos dos ácidos grasos (EPA y DHA)(Hargis y Van Elswyk, 1993; García y Albalá, 1998; González-Esquerra y Leeson, 2001; Surai y Sparks, 2001; Castillo-Badillo et al. 2005; Carrillo et al. 2005; Cherian, 2007; Yalcyn et al. 2007; Yannakopoulos, 2007; Cornejo et al. 2008; Kralik et al. 2008).

2.6 Aceite de sardina

En México los productos pesqueros comercialmente explotables en aguas continentales y territoriales se dividen en 4 grupos (SAGARPA, 2006):

1. Especies pelágicas o masivas (atún, sardina, anchoveta),
2. Especies demersales (huachinango, lisa, tiburón, cazón, peto),
3. Crustáceos y moluscos (camarón, langosta, abulón, ostión, almeja, pulpo, caracol),
4. Especies de cría (mojarra, tilapia, carpa, bagre y langostino)

Cuatro entidades federativas producen cerca del 70% del volumen de pesca (Sonora 35%, Sinaloa 14%, Baja California Sur 10% y Baja California 10%) (CONAPESCA, 2006). A nivel comercial, las especies más explotadas son el atún y el camarón, y en menor escala la sardina y la anchoveta, cuya producción se ha orientado al mercado externo ó a la industria. La parte aprovechable que se obtiene del pescado para consumo humano es solamente el 60% aproximado de su peso, ya que no se utilizan cabezas, esqueletos, vísceras, escamas y aletas. Toda esa masa es en gran parte desaprovechada, ya que la mayoría de los consumidores prefieren comprar el pescado entero y no se acostumbra a su expedición en filetes, lo que ocasiona que los desperdicios se dispersen, sin posibilidad de reunirlos para destinarlos a la industria de subproductos.

Las especies que se capturan para la pesca industrial y que son procesadas como pescado entero crudo para reducción, son principalmente aquellas que no tienen aceptación en el mercado en las formas tradicionales para consumo humano ya sea por razones de elaboración, tamaño, sabor, o cualidades de textura y costumbre a ser comidas, o bien por la elevada cantidad de organismos que se capturan en ciertas estaciones del año,

circunstancia que hace difícil su elaboración rápida. Otra razón por la que no pueden utilizarse estas especies radica en el hecho de que se enrancian tan rápido como para ser almacenadas de un modo económico. Entre esta clase de peces están los arenques, sardinas, parracha, anchoas y caballa. En su mayoría, estos son peces de pequeño tamaño que forman grandes cardúmenes y se prestan a una captura rápida y barata en gran volumen, utilizando artes de pesca de gran rendimiento, como las redes de cerco de tipo globo. Los pescados que presentan carne grasosa (más de 3% de aceite) y de talla pequeña son la base de la industria de la harina y aceite de pescado. Incluso congelados, estos pescados rápidamente se vuelven rancios, a no ser que se tomen medidas especiales que en ocasiones resultan costosas (Cifuentes et al. 1997).

En el noroeste de México, la sardina se pesca en diferentes meses, según la zona y la especie, por lo tanto el recurso está disponible durante todo el año (Moral-Simanek et al. 2010). En las cercanías del Puerto de Guaymas, Sonora se descarga el 80% de la captura de todas las especies conocidas como sardina. El volumen de captura en Sonora es de 15 a 30 mil toneladas/mes. El 85% de la producción es utilizada como materia prima de alimentos, y solo el 15% para productos enlatados y congelados. Como recurso pesquero, la sardina es fuente importante de proteína para la fabricación de alimento balanceado para la industria avícola y porcina, y como carnada para la pesca comercial, deportiva y artesanal (Moral-Simanek et al. 2010).

La sardina monterrey (*Sardinops sagax*) y la sardina crinuda (*Opisthonema libertate*) aportan 75% de la captura total de pelágicos menores. Además, de estas hay otras siete especies que debido a sus volúmenes de pesca, se consideran de menor importancia comercial: la anchoveta (*Engraulis mordax*), otras especies de la sardina crinuda (*O. mediatre* y *O. bulleri*), la japonesa (*Etremeus tares*), la bocona (*Cetengraulis mysticetus*), la macarela (*Scomber japonicus*) y el charrito (*Trachurus symmetricus*). La sardina monterrey es una especie costera, pelágica que forma cardúmenes grandes y puede realizar movimientos amplios dentro de su área de distribución, según las condiciones marinas, de temperatura, corrientes y surgencias, principalmente. Su tasa reproductiva es alta y el crecimiento rápido. Viven en aguas relativamente cálidas y se alimentan principalmente de algas, pequeños crustáceos y fitoplancton (Moral-Simanek et al. 2010).

En México, la industria de la sardina ha registrado cambios importantes, desde sus inicios en 1927 hasta 1975, alrededor del 60% de la producción se destinaba al enlatado para consumo humano, en presentaciones de salsa de tomate y aceite. Sin embargo, a partir de 1976 la situación cambió y los volúmenes más importantes ahora son para elaborar harina, ya que por su alto contenido proteínico y graso se convierte en insumo principal para elaborar alimentos balanceados y aceite para la industria química. La harina y el aceite de la sardina son un complemento redituable para el exceso de captura de esta especie, pues resultan ser negocios mas lucrativos que el enlatado (Moral-Simanek et al. 2010).

Para elaborar una tonelada de harina de pescado (y como subproducto 350 litros de aceite) se requieren en promedio 5.5 toneladas. Una vez procesado, el precio del producto se eleva de manera importante, alcanzando hasta 10 veces mas que su valor original en fresco, pues la tonelada se comercializa entre \$ 350 y \$ 450 dólares y el aceite en aproximadamente \$100 dolares americanos (Júarez-Torres et al. 2007).

Actualmente el grueso de la harina y del aceite de pescado de todo el mundo se fabrica con el método denominado “de reducción o prensadura húmeda”. Este comienza con el desembarque del pescado entero almacenado en las bodegas refrigeradas de los buques transportadores. Entonces los pescados son cocidos al vapor y la resultante masa de sólidos y líquidos son transportados a la prensa. El aceite y agua conteniendo los sólidos disueltos y suspendidos son exprimidos de la masa dejando un intermediario húmedo conocido como torta de prensa. La torta es entonces mezclada con los solubles condensados de la fase líquida y secada suavemente. El producto resultante es entonces mezclado con los solubles condensados de la fase líquida y secada suavemente. El producto resultante es entonces molido a harina y tratado con un antioxidante para ayudar a que la harina mantenga la calidad de su proteína y aceites residuales durante el almacenamiento y transporte. La harina se almacena en sacos o a granel, mientras que el aceite es filtrado y estabilizado con antioxidantes antes de ser almacenado en cisternas (Cifuentes et al. 1997; www.iffonet.net).

En México no existe normatividad para el aceite de sardina para consumo humano directo, sin embargo, existen normas internacionales que establecen las siguientes especificaciones para el aceite de pescado (Cifuentes et al. 1997; www.iffco.net):

Color y estado: amarillo a blanco sólido (12 a 13 escala GARDNER)

Olor: sin olor o ligero olor a pescado

Valor de saponificación: entre 180-200

Número de Iodo: no menos de 120 (160-180)

Materia no saponificable: no más del 2%

Acidos grasos libres: menos de 3% de ácidos grasos libres

Agua e impurezas: 0.8-2%

Asegurar que el consumo total de EPA y DHA no exceda de 3g/persona/día

Si se rebasan estos límites, el valor comercial del aceite de pescado será menor. Por lo tanto, para poder fabricar y conservar un aceite con propiedades adecuadas, se debe utilizar pescado lo mas fresco posible, el aceite debe almacenarse en la oscuridad, con una entrada limitada de oxígeno, y a una temperatura que sea lo mas baja y constante posible, debe estar muy limpio, especialmente no contener metales pesados, exceso de agua y basura (Cifuentes et al. 1997).

Gaméz-Meza et al. (1999) informan un contenido promedio de 20% de EPA y 12% de DHA (del total de ácidos grasos) en el aceite de sardina del Golfo de California. Aun cuando la composición en ácidos grasos de los aceites de pescado varía considerablemente en función de la especie de pescado, composición del plancton con que este se alimentó y la época del año; el alto contenido de estos AG se mantiene a lo largo del año (Bandarra et al. 1997, Cifuentes et al. 1997; Gaméz-Meza et al. 1999). La presencia y contenido de estos AG en el aceite de sardina lo convierten en un ingrediente de alto valor comercial. Además el aceite de pescado presenta una relación n6:n3 muy baja (0.08), de modo que su utilización como ingrediente funcional en otro tipo de alimentos puede contribuir a lograr relaciones 1-4:1, consideradas idóneas en una dieta saludable (Conchillo et al. 2006).

Sin embargo, debido a que los aceites de pescado contienen cantidades significativas de AGPI (36-43%), son altamente susceptibles a la oxidación dando lugar a una rápida producción de aldehídos y cetonas responsables del aroma y sabor a pescado

(Bailey, 1984), de ahí la importancia de utilizar pescado fresco y estabilizar el aceite con antioxidantes .

Aun así, cuando se incorpora aceite de pescado a la dieta de las aves, las características físicas, químicas y sensoriales del huevo fresco para plato, pueden verse afectadas con el paso del tiempo y por la oxidación lipídica, reduciendo así su vida de anaquel (período de tiempo durante el cual un producto puede ser puesto en venta o en anaquel, y a lo largo del cual sus características de calidad física, químicas y sensoriales deben mantenerse deseables desde el punto de vista del consumidor, asegurando además la salud del mismo por ingesta de dicho producto)(Eskin y Robinson, 2001).

Por tal motivo, diversos estudios (Hargis y Van Elswyk, 1993; Maurice, 1994; Cloughley et al. 1997; González-Esquerra y Leeson, 2001; Surai y Spark, 2001) señalan la conveniencia de emplear niveles inferiores al 1.5% de aceite de pescado en la dieta de las aves, y otros como Cherian (2007) mencionan como límite un 3%; a fin de no afectar negativamente el sabor del huevo ni otras características como la producción y peso del mismo y reducir en lo posible el riesgo de una oxidación lipídica.

2.7 Oxidación lipídica

Los procesos de oxidación constituyen una de las principales vías de deterioro de los alimentos, ocasionada por el ataque del oxígeno sobre algunos de sus componentes, lo que lleva a un deterioro de la calidad comercial, organoléptica y sanitaria del alimento (Sánchez-Moreno y Larrauri, 1998).

Los radicales libres, conocidos también como especies reactivas al oxígeno (EROS) y al nitrógeno (ERN), son átomos, moléculas o cualquier otro compuesto que contiene uno o más electrones en forma impar. Estos son altamente inestables y reactivos y son capaces de causar daño a diferentes estructuras moleculares, como el DNA, proteínas, lípidos y carbohidratos. Los diferentes sistemas biológicos están bajo un constante ataque de los radicales libres (RL), formados como consecuencia natural de la actividad metabólica de un organismo y como una estrategia del sistema inmune para destruir a microorganismos invasores.

Las fuentes internas de radicales libres son: las mitocondrias, fagocitos, xantina oxidasa, peroxisomas, ejercicio, inflamación, isquemia, reacciones con Fe y otros metales de transición; mientras que las fuentes externas son: luz, temperatura, metales, el humo del cigarrillo, la radiación, rayos UV, la contaminación, microorganismos, ciertas drogas, reactivos químicos, solventes industriales, así como condiciones de estrés nutricional, como son altas concentraciones de AGPI en la dieta, etc. (Figura 10).

Generalmente se reconoce que en las células vivas, el radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$) es el principal radical libre que se produce (Surai, 2003).

En los alimentos, los macro-componentes menos estables son los lípidos, lo que los hace altamente susceptibles a oxidarse (Eskin y Przybylski, 2001). En la oxidación lipídica, el primer sustrato donde ocurren estas reacciones son los ácidos grasos poliinsaturados y el oxígeno (Figura 10).

Hay tres tipos de mecanismos que intervienen en la oxidación lipídica (Guillén-Sans y Guzmán-Chozas, 1998; Wheatley, 2000; Surai, 2003):

- 1) Generación de radicales libres que actúan en la oscuridad (autooxidación)
- 2) La fotooxidación que inicia con la exposición a la luz
- 3) Acción de la lipooxigenasa

La más estudiada es la primera, la autooxidación, proceso en cadena de radicales libres. De ésta, se han propuesto dos fases.

Primera fase incluye 3 etapas:

Iniciación: La reacción en cadena se inicia por la sustracción de un hidrógeno de la cadena hidrocarbonada del ácido graso insaturado, formando un radical libre del triglicérido o de la molécula libre del AG ($LH \rightarrow L^{\cdot} + H^{\cdot}$). Esto puede ocurrir por interacción del O_2 en presencia de un iniciador. Se considera como iniciador una fuente externa de energía, por ejemplo calor, luz y radiación de alta energía. Sin embargo, los iones metálicos (como el cobre y hierro) o metaloproteínas pueden también actuar como iniciadores y/o catalizadores (Figura 10).

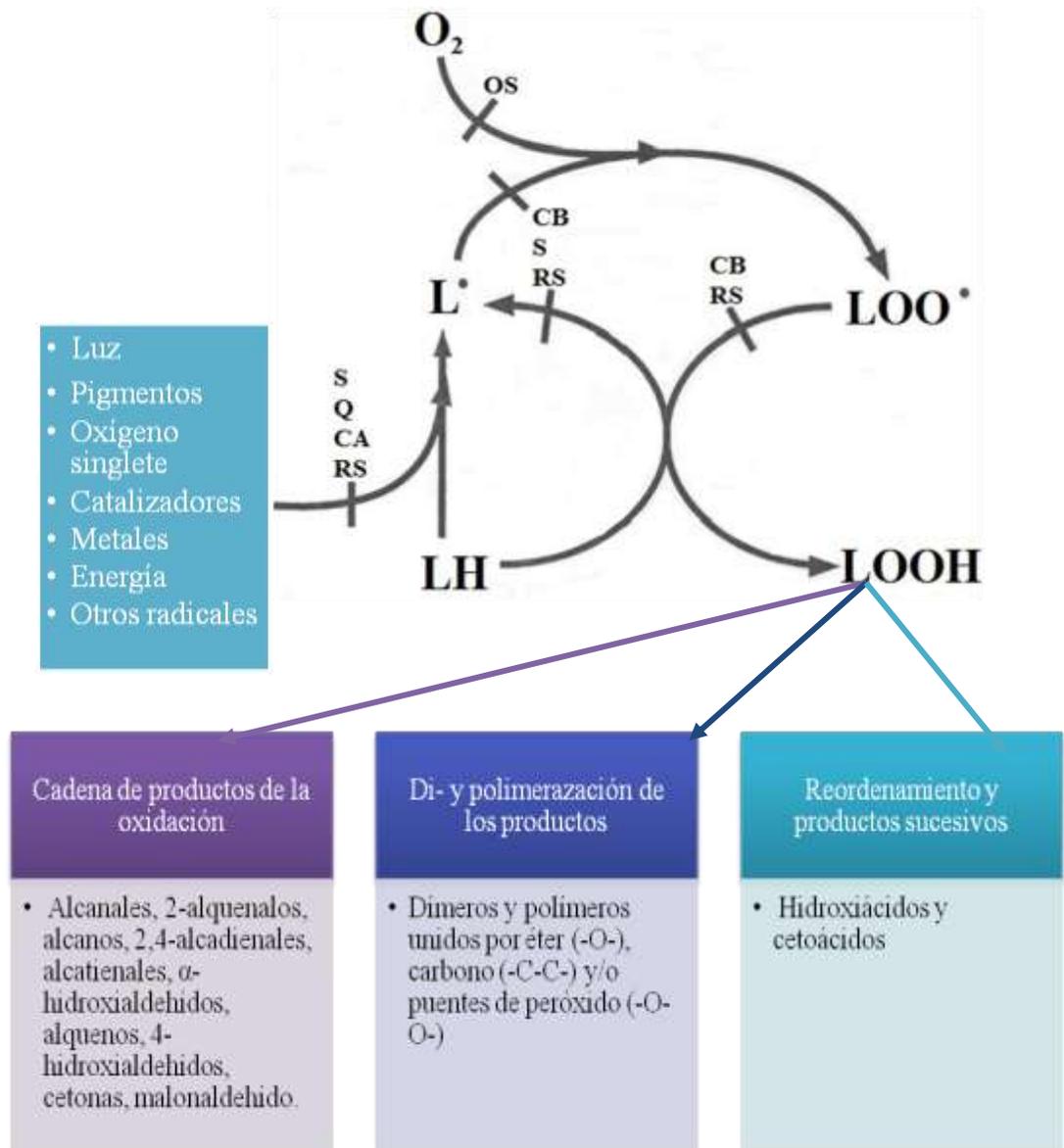


Figura 10. Mecanismo de oxidación de los ácidos grasos

Fuente: Eskin y Przybylski (2001), Surai (2003)

Propagación. Los radicales producidos en el proceso anterior pueden reaccionar con el O_2 para formar un radical peróxido ($L\cdot + O_2 \rightarrow LOO\cdot$), el cual puede seguir sustrayendo hidrógenos a través de una cadena de propagación y puede reaccionar con un triglicérido o un AG insaturado para formar un hidroperóxido y otro radical libre ($LOO\cdot + LH \rightarrow LOOH\cdot + L\cdot$) (Figura 10). Otras especies de oxígeno que pueden reaccionar son O_2^- , HO y H_2O_2 . En esta etapa de propagación se genera una gran cantidad de moléculas de hidroperóxidos. La velocidad de reacción aumenta con el grado de insaturación. El linoleato se oxida 10 veces más rápido que el oleato, y el linolenato de 20 a 30 veces más rápido aún. Las lipooxigenasas son oxidoreductasas que catalizan la conversión de los ácidos grasos poliinsaturados a sus respectivos hidroxiperóxidos. En la oxidación enzimática de los lípidos, se lleva a cabo una sustracción de hidrógeno y una adición del dióxígeno en posiciones específicas; mientras que la oxidación no enzimática, no tiene una región específica de adición, y ocurre generalmente en las posiciones exteriores, donde se encuentra el último carbono antes del primer doble enlace de cada extremo de la molécula.

Terminación. La reacción en cadena puede terminar por medio de la formación de productos que no sean radicales ($L\cdot + L\cdot \rightarrow L-L$; $LOO\cdot + L\cdot \rightarrow LOOL$), como dímeros y grandes polímeros. Los hidroxiperóxidos formados (LOOH) son inestables y se pueden descomponer en una amplia variedad de productos volátiles y no volátiles (Figura 4). Los cuales a su vez son también inestables y pueden dar origen a compuestos responsables de la rancidez en los alimentos (Eskin y Przybylski, 2001).

Segunda fase

En esta fase el proceso oxidativo se realiza a mayor velocidad. Se presenta una fragmentación de los hidroperóxidos. Esta se lleva a cabo en los enlaces carbono-carbono a ambos lados del radical alcoxilo ($RO\cdot$), el cual puede reaccionar con otros radicales. Estas reacciones son las que producen la mayoría de los compuestos carbonílicos, alcoholes, ésteres e hidrocarburos responsables del aroma de oxidación de los lípidos de los alimentos.

Los productos de autooxidación del oleato son el 8-, 9-, 10-, y 11-hidroperóxidos; del linoleato se generan el 9- y 13-dieno hidroperóxidos y del linolenato se forman 9-, 12-, 13- y 16- hidroperóxidos. Los 9- y 13- hidroperóxidos, al tener un sistema dieno conjugado favorecen el ataque del oxígeno en las posiciones más extremas. Algunos de estos compuestos tienden a ciclarse.

La autooxidación puede inhibirse o retardarse por medio de la adición de pequeñas cantidades de antioxidantes los cuales pueden interferir en las etapas de iniciación y/o propagación.

2.8 Antioxidantes

Halliwell et al. (1995) definen como antioxidante a “cualquier sustancia que, estando presente a bajas concentraciones en comparación con el sustrato oxidable, retrasa o previene significativamente la oxidación de dicho sustrato”. La Food and Drug Administration (FDA por sus siglas en inglés)(citado por Eskin y Przybylski, 2001) los define como sustancias usadas para preservar un alimento, retardando el deterioro por rancidez o decoloración debida a la oxidación. La mayoría de los antioxidantes están asociados principalmente con la inhibición de la peroxidación lipídica, aunque como ya se mencionó antes, existen otros sustratos que también pueden ser oxidados como las proteínas, DNA, carbohidratos, etc. Existen diferentes tipos de antioxidantes, de acuerdo al nivel de defensa en que participan (Eskin y Przybylski, 2001; Surai, 2003):

- A) Primer nivel de defensa. Estos antioxidantes previenen o evitan la formación o producción de radicales libres a nivel celular, constituyendo el primer nivel de defensa de un organismo vivo. En este grupo están las enzimas: superóxido dismutasa (SOD) la cual contiene Mn ó Cu/Se, la catalasa (CAT) la cual contiene Fe y la glutatión peroxidasa (GSH-Px) la cual contiene Se.

- B) Segundo nivel de defensa. Estos antioxidantes pueden actuar a nivel de membrana celular y en los alimentos de la siguiente manera:

- Atrapando radicales libres
- Inactivando iones metálicos
- Removiendo EROS
- Interrumpiendo la cadena en la etapa de iniciación
- Atrapando o secuestrando al oxígeno singulete
- Destruyendo peróxidos para prevenir la formación de radicales
- Removiendo el oxígeno y/o la concentración y presión de oxígeno en el medio

Dentro de este grupo están diversos compuestos que, dependiendo de su mecanismo de acción, se clasifican como primarios, secundarios o sinérgicos (Cuadro 5).

Los primarios actúan donando átomos de hidrógeno a los radicales libres de los lípidos, terminando la reacción hasta formar productos estables.

Los antioxidantes secundarios funcionan descomponiendo a los lipoperóxidos en productos finales estables.

Los sinérgicos actúan principalmente como atrapadores de oxígeno (ácido ascórbico, sulfitos) y queladores de metales (EDTA, ácido cítrico, fosfatos). Ellos operan de diferente manera, regenerando a antioxidantes primarios donándoles átomos de hidrógeno a los radicales fenólicos, o proveyendo un medio ácido más estable para estos antioxidantes. Los que están en el grupo de misceláneos son capaces de funcionar como antioxidantes primarios y sinérgicos.

En el caso del huevo enriquecido con ácidos grasos, existe un alto riesgo de oxidación lipídica por las razones antes mencionadas, lo que reduce notablemente la vida de anaquel de estos productos. De hecho, en la Ciudad de México el huevo enriquecido con AGn3 se retira del mercado a los 15 días, mientras que el huevo estándar dura hasta un mes en los supermercados (comunicación personal).

En vista de ello, hoy existe un interés creciente en el uso de antioxidantes naturales, que además de prolongar la vida de anaquel de los alimentos, sean también fuente de compuestos nutraceuticos. Para considerar aceptable el uso de un antioxidante en los

alimentos, este debe ser efectivo a bajas concentraciones, compatible con el sustrato, no debe impartir sabor, olor o color desagradables, debe ser no tóxico, y no debe afectar negativamente las características físicas del alimento. La tendencia mundial es evitar el uso de antioxidantes sintéticos en los alimentos, por posibles riesgos toxicológicos a largo plazo (Eskin y Przybylski, 2001).

Cuadro 5. Antioxidantes que actúan en un segundo nivel de defensa

Primarios	Secundarios	Sinérgicos
Fenoles	Acido tiopropiónico (TDPA)	Atrapadores de oxígeno
Hidroquinona	Dilauril y Diestearil	Sulfitos
Trihidroxibutirofenona	Esteres de TDPA	Acido ascórbico
Acido norhidroguairético		
BHA		
BHT		Agentes quelantes
TBHQ		Polifosfatos
Tocoferoles		EDTA
Tocotrienoles		Acido tartárico
Plastocromanoles		Acido cítrico
		Acido fitico
		Lecitina
Misceláneos		Misceláneo
Etoxiquin		Nitratos
Trolox-C		Aminoácidos
Flavonoides		Flavonoides
Extractos herbales		Carotenoides
Extractos de especias		Extractos de té
Carotenoides		Zinc
Lignanós		Selenio
Ascorbato		Lignanós
		Ascorbato

Fuente: Adaptado de Eskin y Przybylski (2001)

2.9 Antioxidantes utilizados para aumentar la estabilidad oxidativa en huevos enriquecidos con AGn3

La vitamina E es considerada el principal antioxidante natural presente en los sistemas biológicos y juega un importante papel en la regulación del metabolismo. El término se refiere a dos grupos de compuestos con actividad antioxidante: α , β , γ , y δ tocoferoles y α , β , γ , y δ tocotrienoles. La forma biológica más activa es el α -tocoferol y esta forma, a diferencia de las otras, es depositada en los tejidos.

Su presencia en las membranas celulares determina en gran medida la estabilidad ante los efectos dañinos de las condiciones ambientales y protege las estructuras celulares contra la peroxidación lipídica. La incorporación de vitamina E en la ración ha demostrado ser útil no solo para incrementar la concentración de vitamina E en la yema, sino también para corregir la disminución en la estabilidad oxidativa de huevos enriquecidos con AGn3, y reducir o eliminar el sabor a pescado que el huevo llega a adquirir cuando la dieta se suplementa con niveles altos de linaza o aceite de pescado (Ahn et al. 1995; Cherian et al. 1996; Galobart et al. 2001 a,b; Grobas et al. 2002,2005). Aunque se considera que la vitamina E es un potente antioxidante, los resultados no siempre ha sido positivos, y resultan todavía contradictorios.

Cherian et al. (1996) evaluaron el efecto que, la adición de **tocoferoles** a dietas suplementadas con aceite de menhaden, de linaza, de palma, de girasol, tenía sobre la deposición de tocoferol, ácidos grasos, y valores de ácido tiobarbiturico (TBA) en diferentes tejidos (huevo, hígado, tejido adiposo, pierna y muslo). Los resultados mostraron un incremento significativo en el contenido de tocoferol en los diferentes tejidos en el siguiente orden de magnitud: yema de huevo > hígado > tejido adiposo > pierna/muslo > pechuga. La adición de tocoferoles redujo significativamente los valores de TBA en huevo, en hígado solo en los tratamientos con aceite de menhaden y linaza, mientras que en pierna/muslo y en pechuga los valores de TBA se redujeron en los tratamientos con aceite de menhaden. La suplementación con tocoferoles no influyó en forma alguna cuando las dietas incluían aceite de palma.

Leeson et al. (1998) señalan que la adición de niveles altos (100 mg/kg) de **vitamina E** en la dieta no favoreció la aceptabilidad de huevos procedentes de gallinas

suplementadas con 10% de semilla de lino, y que por otra parte, un exceso de vitamina E en la dieta puede resultar en una acción pro-oxidante.

Qi y Sim (1998) al usar **tocopherol** natural (0, 200, 400 y 800 mg/kg de dieta) en dietas suplementadas con 15% de linaza y 0.5% de aceite de pescado, obtuvieron una reducción significativa en los valores de malonaldehído (MDA), de 41.32 a 18.57 nmol/g de yema.

Surai et al. (2000) trabajaron en el desarrollo de un super huevo en el que, a través de la dieta de las aves, incrementaron en forma simultánea las concentraciones habituales de DHA y de antioxidantes naturales presentes en el huevo como son la **vitamina E, luteína y selenio**. Se alcanzó una concentración de 209 mg de DHA, 19.3 mg de VE, 1.91 mg de luteína y 0.032 de Se. Los efectos benéficos de la combinación de DHA con antioxidantes en el huevo fueron: la vitamina E, la luteína y el Se protegieron al DHA de la oxidación durante la absorción y metabolismo, evitando el desagradable olor a pescado. La luteína interactuó con la VE y los fosfolípidos, aumentando el potencial antioxidante de la yema y mejorando la vida de anaquel del huevo. El selenio como parte natural del sistema antioxidante glutatión peroxidasa, protegió a la membrana intestinal contra la peroxidación lipídica durante la digestión y absorción del DHA.

Teniendo en cuenta que los AGn3 son altamente susceptibles a la oxidación, Grune et al. (2001), realizaron un primer ensayo en el que investigaron el efecto sobre el contenido de AGPI, colesterol, **vitamina E** en huevo al suplementar con vitamina E la dieta de las gallinas con diferentes concentraciones de aceite de pescado (0, 0.7, 1.4, 2.8, y 5.6%). Suplementar la dieta con 2.8% y 5.6% de aceite de pescado incrementó considerablemente la cantidad de AGn3 en la yema. La dieta contenía solamente 11 UI de vitamina E/kg, pero esta concentración resultó insuficiente para proteger a los AGPI de la peroxidación. Esto ocasionó un imbalance entre la vitamina E y los AGPI, originando la formación de productos de peroxidación lipídica como el MDA. En un segundo ensayo, las dietas fueron suplementadas con 1.5% de aceite de pescado y diferentes concentraciones de vitamina E (0, 5, 10, 20, 40, 80, 160 IU/kg). El huevo se almacenó durante varias semanas. Los resultados mostraron la necesidad de suplementar la dieta con al menos 80 UI de

vitamina E/kg para prevenir la formación de productos de la peroxidación lipídica durante el almacenamiento de huevos enriquecidos con AGn3.

Galobart et al. (2001c), condujeron un estudio con el objetivo de conocer el efecto que sobre la composición en ácidos grasos y la oxidación lipídica en huevo fresco y deshidratado tenía, suplementar la dieta con dos diferentes aceites (aceite de linaza y aceite de girasol) y dos diferentes dosis de **alfa-tocoferol** (0 y 5 mg/kg) y cantaxantina (0 y 5 mg/kg). La oxidación lipídica fue medida en el huevo fresco y deshidratado a los 0, 6, y 12 meses de almacenamiento. Los resultados mostraron que cuando se suplementó con vitamina E, la estabilidad oxidativa en el huevo enriquecido con AGn3 se incrementó significativamente, no ocurriendo lo mismo con la cantaxantina, la cual no previno la oxidación lipídica. No se detectó ningún efecto sinérgico entre los dos antioxidantes.

Con la finalidad de evaluar el efecto antioxidante del **extracto comercial Rosemary** sobre huevos enriquecidos con AGn3, Galobart et al. (2001a), suplementaron la dieta para gallinas con 500 o 1,000 mg/kg de dicho extracto y lo compararon con dietas suplementadas con 200 mg/kg de α -tocoferol (α -TA). Los resultados mostraron un claro efecto antioxidante del alfa tocoferol, sobre el huevo enriquecido con AGn3; en contraste, la suplementación de la dieta con el extracto de Rosemary no mostró efecto alguno sobre los parámetros de oxidación lipídica evaluados.

Franchini et al. (2002) evaluaron el efecto de suplementar la dieta con dos diferentes dosis de **vitamina E y C**, juntas y separadas, sobre el contenido de vitamina E en la yema, estabilidad oxidativa del huevo fresco y almacenado durante 30, 60, y 90 d a 4°C y a temperatura ambiente por 28 d; así como sobre sus propiedades funcionales y sensoriales. Las gallinas recibieron durante 8 semanas una dieta basal suplementada con 100 ó 200 mg de DL- α -tocoferol acetato/kg, 500 o 1,000 mg de ácido ascórbico/kg, o 100 mg de DL- α -tocoferol acetato mas 500 mg de ácido ascórbico. El grupo testigo no recibió suplementación. El contenido de vitamina E en la yema disminuyó después de los 90 días de almacenamiento a 4°C y después de 28 días a 25°C. El huevo refrigerado no se vio afectado en ninguno de los tratamientos, pero cuando se almacenó durante 4 semanas a temperatura ambiente aumentaron las sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS

por sus siglas en inglés) en el grupo testigo y en el suplementado con las más altas dosis de vitaminas. El sabor del huevo no se vio afectado en ninguno de los casos.

Bernal Gómez et al. (2003) evaluaron la eficacia de antioxidantes naturales provenientes del **orégano y el romero** en la protección contra el deterioro de la fracción lipídica de las yemas de huevos enriquecidos con AGn3. Las aves fueron alimentadas durante 30 días con una dieta suplementada con 0 y 5% de aceite de linaza. Las aves fueron separadas en 8 grupos. En cuatro de ellos las dietas tenían 5% de aceite de linaza (testigo), **BHA+BHT** (100+100 ppm), extracto de orégano (200 ppm), extracto de romero (200 ppm); las otras cuatro no tenían aceite de linaza, pero sí los mismos antioxidantes. Los resultados mostraron que tanto los antioxidantes sintéticos como los naturales ofrecieron protección contra la oxidación lipídica cuando las dietas fueron suplementadas con aceite de linaza y también cuando se suministró sin linaza.

Botsoglou et al. (2005), evaluaron el efecto antioxidante de los **estigmas rojos de la planta saffron griego (*Crocus sativus* L.)** en huevos refrigerados, así como, en yemas almacenadas en presencia de luz. Gallinas de 38 semanas de edad se distribuyeron en 4 grupos: dieta testigo, dieta enriquecida con 10 o 20 mg/kg de saffron (SAF10, SAF20), o una dieta enriquecida con 200 mg/kg de α -tocoferol (VE200). Durante 6 semanas de alimentación, los huevos fueron recolectados y el grado de oxidación lipídica fue determinado en ellos. Los resultados mostraron que el grado de oxidación lipídica, medida a través de la formación de malonaldehído (MDA), difirió entre tratamientos pero no cambió con el tiempo de almacenamiento. Las yemas del grupo testigo tuvieron valores más altos de MDA que aquellas de los tratamientos con SAF10, y éstos a su vez, mostraron valores más altos que las yemas de los tratamientos con SAF20. El grupo con VE200 mostró los valores más bajos de MDA. Sus hallazgos sugieren que el saffron posee actividad antioxidante.

Mohiti-Asli et al. (2008), investigaron el efecto que la **vitamina E y el selenio orgánico e inorgánico** tienen sobre la calidad física y estabilidad lipídica del huevo, cuando estos son adicionados a la dieta. Las aves de 63 semanas de edad fueron divididas en 6 grupos: cinco recibieron una dieta basal suplementada con 0.4 mg kg^{-1} de selenito de sodio o levadura con selenio, 200 mg kg^{-1} de vitamina E o una combinación de selenio y

vitamina E; mientras que en el grupo testigo la dieta no fue suplementada. El estudio duró 7 semanas. Los huevos fueron almacenados bajo diferentes condiciones (4°C, 23–27°C o 31°C) por 14 d. Las variables productivas y calidad física del huevo no fueron afectadas por la fuente de selenio o por la vitamina E. La concentración de Se y vitamina E aumentaron significativamente en el huevo. La calidad, estabilidad oxidativa y composición en ácidos grasos del huevo fueron superiores en los grupos que recibieron dietas suplementadas.

Bou et al. (2009) realizaron una revisión sobre algunas de las estrategias que se han empleado para mejorar la estabilidad oxidativa y las características sensoriales del huevo enriquecido con ácidos grasos de cadena larga. Señala el uso de vitaminas como el **alfa-tocoferol y el ácido ascórbico**, minerales como el **selenio y el zinc**; así como algunos ingredientes naturales como el **oregano, Rosemary, safron** y la suplementación de las dietas con **isoflavonas y carotenoides** como el **licopeno y la cantaxantina**.

Hayat et al. (2010), condujeron un estudio cuyo objetivo fue investigar el efecto que, sobre el perfil de ácidos grasos, estabilidad oxidativa, y concentración de vitamina E en huevos enriquecidos con AGn3 tiene suplementar la dieta con vitamina E y BHT. Las gallinas fueron alimentadas con: dietas maíz-soya (testigo) y con 100 g/kg of semilla de linaza y dos tipos de antioxidantes, **α -tocoferol y BHT** at 0, 50, 100, o 150 mg/kg. Los huevos fueron almacenados durante 20, 40, y 60 días a 4°C. En el huevo de las gallinas alimentadas con linaza aumentó el contenido de los ácidos grasos α -linolénico (18:3n-3), eicosapentaenoico (20:5 n3), y docosahexaenoico (22:6n3); pero decreció la concentración del araquidónico (20:4 n6) y la relación n6:n3 en comparación con el testigo. Con excepción del tratamiento linaza+100 mg de BHT, la adición de antioxidantes ocasionó una reducción en el contenido de ácido palmítico en el huevo fresco. Durante los primeros 20 días de almacenamiento, se observó una reducción superior a 17% en el total de AGn3 en el huevo de los tratamientos con linaza+50 mg de BHT. Suministrar linaza llevó a un incremento en las sustancias reactivas al TBA en el huevo, el α -tocoferol fue mejor que el BHT para prevenir la oxidación lipídica al día 0 de almacenamiento. Sin embargo, ninguno de ellos mostró un efecto significativo sobre las TBARS a los 60 días de almacenamiento. El estudio mostró que el nivel y tipo de antioxidante, así como, la duración en el tiempo de

almacenaje afecta significativamente el perfil de ácidos grasos, concentración de vitamina E y la estabilidad oxidativa en el huevo.

Aun así, existen otros ingredientes y compuestos que también pueden ser una alternativa interesante, ya que además de la protección antioxidante que proporcionan a los AGPI, pueden brindar beneficios adicionales al producto y al consumidor (ej. una mejor coloración de la yema, compuestos nutraceuticos, etc). Este podría ser el caso de las algas marinas y el ácido linoleico conjugado.

2.10 Algas marinas

Las algas marinas constituyen el 71 % de la superficie de nuestro planeta. Conforman un grupo muy heterogéneo de plantas que por su tamaño se les divide en microalgas y macroalgas (El Gamal, 2010).

Las microalgas se encuentran tanto en la zona litoral como en la báltica, así como, en las aguas oceánicas en la forma de fitoplancton (diatomeas, dinoflagelados, etc). Las macroalgas ocupan la zona litoral y de acuerdo a sus pigmentos se les divide en tres grandes grupos (Chapman y Chapman, 1980):

- ✓ **Clorofitas o algas verdes** (Ej. *Ulva*)
- ✓ **Feofitas o algas pardas.** Ej. *Macrocystis*, *Sargassum*, etc.
- ✓ **Rodofitas o algas rojas:** Ej. *Porphyra columbina* y *Gigartina chamissoio*

Las macroalgas se caracterizan por tener un bajo contenido calórico (1-3 kcal/g) y de lípidos (0.9-5.2%), un alto contenido de material inorgánico (8-44%), un contenido de proteína que se ubica en un intervalo entre 5-38%. Son fuente importante de polisacáridos complejos (alginatos, agar, laminarina, fucoidina, galactanos, carragenina), con un contenido aproximado de 29-75% de fibra dietaria (Carrillo et al. 2002; Yuan, 2008).

Las algas marinas, por ser organismos fotosintéticos, están expuestas a la luz solar y a altas concentraciones de oxígeno, lo que da lugar a la formación de radicales libres y otros agentes oxidantes. Sin embargo, la ausencia de daños en los AGPI (importantes componentes estructurales de los tilacoides, especialmente vulnerables a la fotooxidación)

de las algas demuestra que las células de estos organismos marinos tienen mecanismos y compuestos que previenen y los protegen de la oxidación (Ramarathanam et al., 1995; Matsukawa et al. 1997; Freile, 2001; Allen et al. 2001; Yuan, 2008; El Gamal, 2010). Estos compuestos antioxidantes presentes en las algas marinas son de naturaleza muy variada y se les separa de la siguiente manera:

Antioxidantes hidrosolubles

Polifenoles. En este grupo se incluye no solo a los flavonoides, sino también a lignanos, ligninas, tocoferoles, taninos, florotaninos y ácidos fenólicos (Nakamura et al. 1996; Yuan, 2008; El Gamal, 2010). El mecanismo a través del cual estos compuestos actúan como antioxidantes, es secuestrando a las EROS, atrapando al oxígeno reactivo y quelando iones metálicos como el Fe^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} (Yuan, 2008). Otro mecanismo propuesto para los ácidos fenólicos es que, el radical peroxilo extrae un H^{\cdot} del antioxidante para generar el radical aroxilo (del ácido fenólico) y el hidroperóxido. Un segundo mecanismo sería que los radicales peroxilo y aroxilo reaccionan entre sí para formar un compuesto que ya no es un radical (Cuppert et al. 1997).

Las feofíceas poseen las más altas concentraciones de estos compuestos (5-15% de peso seco) en comparación con las rodofíceas y clorofíceas (Ragan y Craig, 1973; Matanjun et al. 2008).

Vitamina C ó ácido ascórbico. Esta tiene la propiedad de formar un radical libre intermediario en la oxidación formándose el ácido dehidroascórbico. El proceso de oxidación es reversible y se realiza a través de un mecanismo que implica la formación del radical anión ($\text{A}^{\cdot-}$) como intermediario. Este tiene un electrón sin aparear distribuido por todo el sistema conjugado tricarbonilo. El radical anión es muy estable y no reactivo y se reestructura principalmente por autorreacción, terminando la reacción en cadena de radicales libres.

En los sistemas biológicos sensibles a las reacciones con los radicales libres, las vitaminas E y C actúan sinérgicamente. La vitamina E, que es lipofílica, se considera como el antioxidante primario, especialmente en la peroxidación de los lípidos en las membranas celulares. La vitamina C reacciona con el radical vitamina E para regenerarla y el radical

ácido ascórbico resultante puede a su vez ser reducido nuevamente a vitamina C por el NADH (Wong, 1989).

La concentración de la vitamina C en las clorofíceas y feofíceas está entre 500-3000 mg/kg de materia seca, mientras que las rodofíceas tienen, entre 100 y 800 mg/kg (Qasim y Barkati, 1985). Sin embargo, es importante mencionar que cuando las algas se exponen al aire y al sol para su secado, hay una gran pérdida de esta vitamina, en virtud de su alta sensibilidad a agentes externos, como la luz y altas temperaturas (Freile, 2001; Yuan, 2008).

Antioxidantes liposolubles

Tocoferol o vitamina E. Las feofíceas presentan las concentraciones más altas de esta vitamina en comparación con las rodofíceas y clorofíceas. Algas de los géneros *Ascophylum* y *Fucus* presentan concentraciones de 200-600 mg de vitamina E/kg de materia seca (Solibami y Kamat, 1985). Otros autores (Nakamura et al. 1994; Jiménez-Escrig y Goñi, 1999), informan un contenido de 2.3-41.2 mg/100g, frente a valores más bajos en algas verdes y rojas (0.8 mg/100g en peso seco). En las feofíceas, predomina la forma activa de α -tocoferol, mientras que en las algas de los otros grupos predominan la α y δ -tocoferol (Yuan, 2008).

Carotenoides. Como los tocoferoles, los carotenos, principalmente el β -caroteno es efectivo para amortiguar al O_2 , retornándolo al estado triplete relativamente sin reactividad. La eficiencia de este efecto se incrementa cuando en la estructura del caroteno hay nueve o más dobles enlaces. El mecanismo se basa en la deslocalización de los electrones no apareados de las especies peroxilo y radicales libres sobre el sistema conjugado poliene del carotenoide (Cuppett et al. 1997).

En las rodofíceas predominan α y β carotenos, así como sus derivados, luteína y zeaxantina. En las clorofíceas, los principales carotenoides son el β caroteno, luteína, violaxantina, zeaxantina, anteroxantina y neoxantina. Las algas pardas son particularmente ricas en carotenoides, tienen un alto contenido de fucoxantina, β -carotenos y violaxantina. En algas del género *Sargassum* se ha informado una concentración de 97 UI/g peso húmedo (Yan et al. 1999; Yuan, 2008).

Clorofila y sus derivados. La clorofila *a* y sus derivados (feofitinas) presentes en la fracción de los lípidos neutros, son capaces de actuar con los radicales peróxido. La feofitina *a* y la pirofeofitina *a* han sido identificados como responsables de la actividad antioxidante del alga verde *Enteromorpha* y del alga parda *Eisenia bicyclis*, respectivamente. Estos compuestos muestran un efecto sinérgico con la vitamina E (Freile, 2001).

Fosfolípidos. El fosfatidil inositol ha sido aislado de la fracción fosfolipídica de las especies *Fucus* spp. y *Ascophyllum nodosum*. Otros fosfolípidos como la fosfatidil etanolamina, colina y serina aislados de *Eisenia bicyclis* presentaron un efecto antioxidante sinérgico con la vitamina E (Freile, 2001).

El empleo de las algas marinas en la alimentación aviar ha sido ya documentado, y en ellos se ha recomendado el uso de las macroalgas en niveles inferiores al 10% ya que por su elevado contenido en sales, niveles superiores producen heces muy líquidas (Jensen, 1971; Rojkind, 1977; Carrillo et al. 1990, 1992, 2008). Sin embargo, su efecto antioxidante sobre huevos enriquecidos con AGn3 no ha sido estudiado a la fecha.

En México existen alrededor de 1600 especies de macroalgas marinas (http://www.conabio.gob.mx/institucion/estudio_pais/CAP3.PDF). Las algas del género *Sargassum*, conocidas comúnmente como Sargazo, son de particular interés, ya que en México se les encuentra formando grandes mantos en aguas tropicales y subtropicales. Estas algas pertenecen a la División Phaeophyta, Clase Phaeophyceae, Orden Fucales, y cuenta con cerca de 400 especies. Tienen un aspecto frondoso, presentan una estructura de fijación llamado rizoide, del cual sale un eje llamado cauloide, de este se desarrollan ramificaciones secundarias, de las que a su vez se desprenden láminas en forma de hojas (filoides), así como numerosas vesículas de aire llamadas aerocistos. Sus dimensiones pueden variar de 15 cm a 22 m (Figura 11). En el Golfo de California se ha estimado un potencial de 180 000 toneladas cosechables de las algas *Sargassum*. A la fecha este recurso no se explota comercialmente, aunque se cuenta ya con la tecnología necesaria para su cosecha, secado y molienda (Casas, 2009).

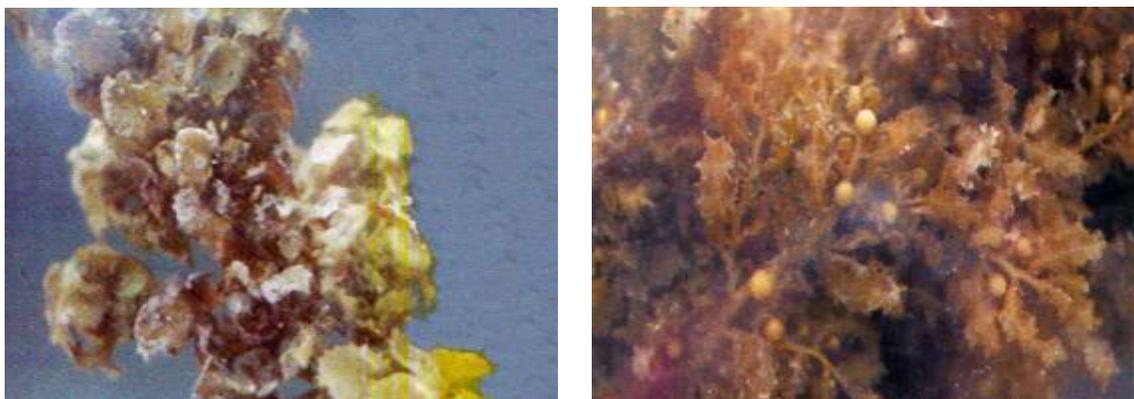


Figura 11. Algas del género *Sargassum*

2.11 Acido linoléico conjugado (CLA)

En la mayor parte de las ocasiones, los AGPI de los tejidos animales tienen distribuidos los dobles enlaces guardando una distancia de 3 carbonos entre dos dobles enlaces, existiendo un carbono intermedio que no participa en ningún doble enlace (ej. El ácido linoléico c9, c12 C18:2). No obstante, en circunstancias excepcionales, asociado a procesos de hidrogenación de los ácidos grasos, estos dobles enlaces se pueden situar a una distancia de tan solo dos carbonos, de modo que habrá cuatro carbonos consecutivos que participen en dobles enlaces. A este tipo de enlaces se les denomina conjugados (de manera natural se presentan en los rumiantes). El ácido linoléico conjugado (CLA) está constituido por una mezcla compleja de isómeros del C18:2 con dobles enlaces conjugados en posición 8-10, 9-11, 10-12 y 11-13, con todas las combinaciones posibles de enlaces tipo *cis* y *trans* 8 (Aydin, 2005; Hur et al. 2007). En los productos comerciales son los isómeros *cis*9, *trans* 11 y el *trans* 10, *cis* 12 los que predominan (Figura 12).

En los tejidos animales el CLA se distribuye en los fosfolípidos, principalmente en la fosfatidiletanolamina, por lo que estaría participando en la determinación de las propiedades químicas y biológicas de las membranas celulares (fluidez, permeabilidad, transmisión de señales, etc.). En humanos se ha observado la presencia de CLA, ya sea en leche o plasma sanguíneo. En la leche, el isómero más frecuente es el 9*c*-11*t*, cuyos niveles fluctúan en 0.15%-0.22%, mientras que 7*t*-9*c* se encuentra en niveles de 0.03% de los lípidos totales. En el suero sanguíneo humano el 9*c*-11*t* llega a constituir hasta el 0.4-0.5% del total de lípidos circulantes. Esta concentración depende de la alimentación. La carne de

rumiantes es la que tiene una mayor concentración, mientras que la de cerdo tiene bajos niveles. En el caso de aves, dado que su alimentación es principalmente de origen vegetal, los niveles de CLA en la carne o huevo son muy bajos (Aydin, 2005; Chow, 2008).

Recientemente se ha despertado un creciente interés por el CLA, ya que a partir de su purificación y síntesis se demostró su eficacia en la supresión de distintos tumores (estómago, próstata, colon y mama) en distintos modelos animales, a concentraciones en la dieta tan bajas como 0.05%. De acuerdo con Sanhueza et al. (2002) fue el grupo de Pariza y Ha (1990) quienes publicaron por primera vez sobre los efectos benéficos al consumir CLA. A partir de ahí se incrementó la información sobre estos. En la actualidad se considera que el CLA es un regulador metabólico que tiene los siguientes efectos (Aydin, 2005; Hur et al. 2007; Chow, 2008):

- a) Hipocolesterolémicos, disminuye los niveles plasmáticos de colesterol con una respuesta similar a la que se obtiene con los AGn3, e hipotriglicéridémica. Por lo que se le atribuye un efecto antiaterogénico.
- b) En el sistema inmune ejerce una estimulación en la síntesis de IgA, IgG, IgM y en la disminución significativa de los niveles de IgE. Esto ha traído como consecuencia que se considere como potencialmente efectivo en la prevención o tratamiento de alergias alimentarias. Las acciones sobre el sistema inmune atribuidas al CLA guardan estrecha relación con su efecto en la prevención del desarrollo de ciertos cánceres.
- c) Anticancerígeno. Su acción sobre el cáncer mamario parece ser el más significativo. El CLA es más eficiente en la prevención de este tipo de cáncer que el ácido oleico, linoleico y que los AGn3, EPA y DHA (Ip, 1997).
- d) Reducción en el peso corporal. La administración de una dieta que contiene 5% de aceite de maíz suplementada con un 0.5% de CLA a ratas desde las seis semanas de edad, produce a las cuatro semanas de administración de la dieta, una reducción del 60% del contenido de grasa del tejido adiposo (Rahman et al. 2001). Estudios realizados con personas con sobrepeso u obesas, han mostrado que la ingesta diaria de 3.4 g de CLA produce una disminución de la masa grasa total sin afectar otros parámetros metabólicos, como el recuento eritrocitario y la cantidad de masa magra.

Se ha sugerido que el ácido graso afecta la interconversión metabólica de los AG generando una activación de la lipólisis, probablemente por una activación de la beta oxidación mitocondrial y una disminución de los niveles de leptina. Además podría estar involucrado en la estimulación de la actividad de la carnitina palmitoil-transferasa. Aunado a estas acciones, se ha considerado la inhibición de la actividad de la lipoproteína lipasa dependiente de heparina, disminuyendo la biodisponibilidad de los AG hacia los tejidos extra hepáticos.

e) Antioxidante. Algunos autores señalan que es más potente que el α -tocoferol y aún mas efectivo que el butil hidroxitolueno (BHT)(Ha et al. citado por Ahn et al. 1999; Hur et al. 2007). La información publicada en relación a este efecto no es contundente; sin embargo, en modelos *in vivo* el CLA produce una disminución significativa en los niveles de peróxidos y de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico. Estudios *in vitro* han demostrado que el CLA posee una efectiva capacidad para atrapar radicales libres por lo que se considera un potente antioxidante (Banni et al. 1998).

En los últimos años se han realizado algunos trabajos con el objetivo de enriquecer el huevo con CLA. Chamruspollert y Sell (1999) mostraron que huevos producidos por gallinas alimentadas con 5% de CLA contienen aproximadamente 310 a 365 mg de CLA/huevo, aunque características físicas como el color de la yema y el sabor fueron afectados en forma negativa.

Aii et al. (1999) informan que cuando a las gallinas se les dio una dieta convencional (99%) con 1% de CLA, la concentración de CLA en suero y en la yema aumentó significativamente.

Con la finalidad de saber como el CLA influye sobre la composición de los AGPI en el huevo, Du et al. (2000) realizaron un ensayo en el que suministraron a las gallinas, dietas con un alto contenido de ácido linoleico (LA) o linolénico (ALA), usando en la formulación aceite de soya y de linaza. Observaron un incremento significativo en la concentración de DHA cuando se suplementó en forma conjunta aceite de linaza+CLA.

Jones et al. (2000) obtuvieron una concentración de aproximadamente 3 mg de CLA/g de grasa al suministrar a las aves una dieta con 1% de CLA.

El efecto sobre algunas características de calidad del huevo enriquecido con CLA, han sido evaluadas por Ahn et al. (1999), incorporando 2.5% y 5% del mismo en la dieta de las gallinas y encontraron que suplementar la dieta con 5% de CLA afecta negativamente la textura de la yema.

Shang et al. (2004), proporcionaron a las aves dietas con 0, 1, 2, 3, 4, 5 ó 6% de CLA y observaron que conforme aumentaba el nivel de inclusión de CLA, el peso de la yema y del albumen disminuyeron. La firmeza de la yema aumentó en el huevo cocido y en el huevo almacenado por 28 días a 4°C; mientras que el contenido de agua en la yema y el pH aumentaron.

Con el objetivo de enriquecer el huevo con CLA, Suksombat et al. (2006) realizaron un estudio en el que suplementaron la dieta de las gallinas con 0, 1, 2, 3 y 4% de CLA. Y encontraron que con 4% de CLA el peso del huevo, de la yema y del albumen se reducía significativamente. El color de la yema, el total de AGM y de AGPI disminuyeron conforme aumentó el nivel de inclusión del CLA. El grosor del cascarón y las Unidades Haugh no se vieron afectadas.

Al parecer, los efectos negativos observados cuando se suplementa con solo el CLA, pueden ser prevenidos con la adición de pequeñas concentraciones de otro aceite en la dieta (Azain, 2003).

Alvarez et al. (2004), realizaron un estudio en el que suministraron a gallinas ponedoras dietas suplementadas con CLA (1,3 y 5 g/kg) y aceite de pescado (0%, 1% y 2%), con el objetivo de obtener huevos con doble valor agregado (un alto contenido de AGn3 y CLA), después de un período de suplementación de 28 días. El consumo de alimento, producción de huevo, peso de huevo, grosor de cascarón y color de yema no se vieron afectados en ningún tratamiento. La suplementación con CLA ocasionó un incremento en el peso, firmeza, humedad y pH de la yema; así como, en la concentración de AGS y de los n3. Los AGM y los n6 disminuyeron. Ni el nivel de inclusión de aceite de pescado (AP) en la dieta, ni la interacción CLA x AP afectaron significativamente estas

variables. Por otra parte, la inclusión de AP+CLA tuvo un efecto lineal negativo sobre la concentración total de AGS y CLA.

Cherian et al. (2007) condujeron un ensayo, con el fin de investigar el efecto que tiene suplementar la dieta para gallinas con CLA (0.25%) y diferentes tipos de grasa (2.50% y 2.75% de grasa amarilla y/o 0.25% de aceite de pescado), sobre el contenido de CLA, AGn3 y vitamina E en el huevo, cuando éste es almacenado durante 60 días a 4°C. Los resultados mostraron una reducción significativa en el contenido de vitamina E, a los 40 y 60 días, en todos los tratamientos, principalmente en aquellos que incluían CLA y/o AP. Por otra parte, el contenido de lípidos totales, CLA y AGn3 en el huevo disminuyeron significativamente en los tratamientos con CLA y/o AP. La estabilidad oxidativa de los lípidos en el huevo, fue afectada significativamente, tanto por la dieta como por el tiempo de almacenaje. A los 40 días hubo una mayor oxidación lipídica en todos los tratamientos; sin embargo, a los 60 días, el tratamiento que tenía grasa amarilla+CLA mostró una mayor oxidación lipídica (medida en mg de MDA/g de yema).

III. Referencias

- Ahn DU, Sunwoo HH, Wolfe EH, Sim JS. 1995. Effects of dietary alfa-linolenic acid and strain of hen on the fatty acid composition, storage stability, and flavor characteristics of chicken eggs. *Poult Sci.* 74: 1540-1547.
- Ahn DU, Sell JL, Jo C, Chamruspollert M, Jeffrey M. 1999. Effect of dietary conjugated linoleic acid on the quality characteristics of chicken eggs during refrigerated storage. *Poultry Sci.* 78: 922-928.
- Aii T, Matsuzaki S, Sakamoto K, Hayasawa H, Shimuzu T, Ishida S. 1999. A newly discovered effect of conjugated linoleic acid: damage to the hatchability of fowl eggs. *Anim Sci J.* 70:246-247.
- Allen VG, Pond KR, Sakers KE, Fontenot JP, Bagley CP, Ivy RL, Evans RR, Schmidt RE, Fike JH, Zhang X, Ayad JY, Brown CP, Millar MF, Montgomery J, Mahan J, Wester DB, Melton C. 2001. Tasco: Influence of a brown seaweed on antioxidant in forages and livestock-A Review. *J Anim Sci* 79 (E Suppl): E21-E31.
- Alvarez C, Cachaldora P, Méndez J, García-Rebollar P, De Blas JC. 2004. Effects of dietary conjugated linoleic acid and fish oil supplementation on performance and egg quality in laying hens. *Br Poult Sci.* 45, 524-529.
- Anton M. 2007. Composition and structure of hen egg yolk. In: *Bioactive Egg Compounds*. Rainer Huopalahti, Rosina López-Fandiño, Marc Anton and Rüdiger Schade (editors), pp.1-6. Springer-Verlag Berlin Helderberg.
- Aydin R. 2005. Conjugated linoleic acid: chemical structure, sources and biological properties. *Turk J Vet Anim Sci.* 29:189-195.
- Azain MJ. 2003. Conjugated linoleic acid and its effects on animal products and health in single-stomached animals. *Proc Nutr Soc* 62: 319-328.
- Bailey AE. 1984. *Aceites y Grasas Industriales*. Segunda edición. Editorial Reverté. 675 pp.
- Bandarra N, Batista I, Nunes M, Empis J, and Christie W. 1997. Seasonal changes in lipid composition of Sardine (*Sardina pilchardus*). *J Food Sci* 62: 40-42.

- Banni S, Angioni E, Contini MS, Carta G, Casu V, Iengo GA, Melis MP, Deiana M, Dessi MA, Corongiu FP. 1998. Conjugated linoleic and oxidative stress. *JAOCS* 75:261-267.
- Bernal Gómez ME, De Mendonca-Junior CX, Mancini-Filho J. 2003. Estabilidad oxidativa de huevos enriquecidos con ácidos grasos poliinsaturados omega 3, frente a antioxidantes naturales. *Rev Bras Cienc Farm* 39 (4):
- Bohinski R.C. 1991. *Bioquímica*. Editorial Addison Wesley Iberoamericana. México, D.F. 739 p.
- Botsoglou NA, Florou-Paneri P, Nikolakakis I, Giannenas I, Dots V, Botsoglou EN, Aggelopoulos S. 2005. Effect of dietary saffron (*Crocus sativus* L.) on the oxidative stability of egg yolk. *Br Poult Sci* 46:701-707.
- Bou R, Codony R, Tres A, Decker EA, Guardiola F. 2009. Dietary strategies to improve nutritional value, oxidative stability, and sensory properties of poultry products. *Critical Rev Food Sci Nutr* 49:800-822.
- Burke WH. 1999. Reproducción de las aves. En: *Fisiología de los Animales Domésticos de Dukes*. M.Swenson y W.O.Reece (editores), pp.728-749. Segunda edición. Editorial LIMUSA, México D.F.
- Carranco JME, Calvo CC, Arellano ML, Pérez-Gil RF, Ávila GE, Fuente MB. 2003. Inclusión de la harina de cabezas de camarón *Penaeus* sp. en raciones para gallinas ponedoras. Efecto sobre la concentración de pigmento rojo en yema y calidad de huevo. *Interciencia* 28: 328-333.
- Carrillo DS, Casas VMM, Castro GMI, Pérez-Gil RF, García VR. 1990. Empleo del alga marina *Macrocyctis pyrifera* en dietas para pollos de carne. *Investigación Agraria: Prod Sanid Anim* 5 (3):137-144.
- Carrillo DS, Castro GMI, Pérez-Gil RF, Rosales E, Manzano RE. 1992. The seaweed (*Sargassum sinicola* Setchel and Garder) as an alternative for animal feeding. *Cuban J Agric Sci* 26: 177-184
- Carrillo DS, Casas VMM, Ramos RF, Pérez-Gil RF, Sánchez RI. 2002. Algas marinas de Baja California Sur, México: Valor nutrimental. *Arch Lat Nutr* 52 (4): 400-405.
- Carrillo DS, Carranco JME, Castillo DRM, Castro GMI, Avila GE, Pérez-Gil RF. 2005. Cholesterol, n-3 and n-6 fatty acids content in eggs from laying hens fed with Red Crab Meal (*Pleuroncodes planipes*). *Poultry Sci*. 84: 167-172.
- Carrillo S, López E, Casas MM, Ávila E, Castillo RM, Carranco ME, Calvo C, Pérez-Gil F. 2008. Potential use of seaweeds in the laying hen ratio to improve the quality of n-3 fatty acid enriched eggs. *J Appl Phycol* 20:721-728.
- Casas VM. 2009. El alga marina *Sargassum* (Sargassaceae) en el desarrollo regional. En: *Recursos Marinos y Servicios Ambientales en el Desarrollo Regional*. JI Urciaga-García, LF Beltran-Morales, D Lluch-Belda. pp.139-156. Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste SC, Universidad Autónoma de Baja California Sur, Centro Interdisciplinario de Ciencias Marinas-IPN. México.
- Castillo-Badillo C, Vázquez-Valladolid JL, González-Alcorta M, Morales-Barrera E, Castillo-Domínguez RM, Carrillo-Domínguez S. 2005. El aceite de atún como fuente de ácidos grasos w-3 en el huevo de gallina. *Grasas y Aceites* 56: 153-159.
- Chamruspollert M, J Sell. 1999. Transfer of dietary conjugated linoleic acid to egg yolks of chickens. *Poult Sci* 78: 1138-1150.
- Chapman VJ, Chapman DJ. 1980. *Seaweeds and their Uses*. Chapman and Hall, Third edition, London.
- Cherian G. 2007. Omega-3 Fatty Acids. In: *Wild-Type Food in Health Promotion and Disease Prevention*. F.De Meester and R.R. Watson (Editors), pp. 169-176. Humana Press Inc. Totowa, NJ, USA.
- Cherian G, Wolfe FW, Sim J. 1996. Dietary oils with added tocopherols: effects on egg or tissue tocopherols, fatty acids, and oxidative stability. *Poult Sci* 75: 423-431.
- Chow CK. 2008. *Fatty Acids in Foods and their Health Implications*. Third edition. CRC Press, Boca Raton, Florida, USA. 1281 p.
- Cifuentes LJJ, Torres GP, Frías MM. 1997. El oceano y sus recursos II. Las ciencias del mar: oceanografía geologica y oceanografía química. Fondo de Cultura Económica, México D.F.
- Cloughley J, Noble R, Speake B, Sparks N. 1997. Manipulation of docosahexaenoic (C22:6 n3) acid in the chicken's egg. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids* 57:222.
- CONAPESCA. 2010. Distribuirán más de 100 mil toneladas de productos pesqueros y acuícolas en cuaresma y Semana Santa.
[www.conapesca.sagarpa.gob.mx/wb/cona/15 de febrero de 2010 mazatlan sin.](http://www.conapesca.sagarpa.gob.mx/wb/cona/15%20de%20febrero%20de%202010%20mazatlan%20sin)

- Conchillo A, Valencia I, Puente A, Ansorena D, Astiasarán I. 2006. Componentes funcionales en aceites de pescado y de alga. *Nutr Hosp* 21 (3): 369-373.
- Cornejo S, Hidalgo H, Araya J, Pokniak J. 2008. Suplementación de dietas de gallinas de postura comercial con aceites de pescado de diferentes grados de refinación. Efectos productivos en las aves y en la calidad organoléptica de los huevos. *Arch Med Vet* 40: 45-50.
- Crespo N, Esteve GE. 2001. Dietary fatty acid profile modify abdominal fat deposition in broiler chickens. *Poultry Science* 80(1): 71-78.
- Cuppett S, Schnepf M, Hall CIII. 1997. Natural Antioxidants-Are They a Reality? In: Shahidi F. Ed. *Natural antioxidants: Chemistry, health, effects and applications*. AOACS Press, Champaign, USA. pp 12-19.
- Dixon JL, Furukawa S, Ginsberg HN. 1991. Oleate stimulates secretion of apolipoprotein B-containing lipoproteins from Hep G2 cells by inhibiting early intracellular degradation of apolipoprotein. *Br J Biol Chem* 266(8): 5080-5086.
- Du M, DU Ahn, JL Sell. 2000. Effects of dietary conjugated linoleic acid and linoleic: linolenic acid ratio on polyunsaturated fatty acid status in laying hens. *Poult Sci* 79, 1749-1756.
- Dupont J.I. 1999. Fats and Oils. Nutritional Value. In: *Encyclopedia of Human Nutrition*. M.J Sadler, J.J Strain and B. Caballero (eds). Academic Press. London. pp719-729.
- El Gamal AA. 2010. Biological importance of marine algae. *Saudi Pharmaceutical J.* 18:1-25.
- ENSANUT. 2012. Encuesta Nacional de Salud y Nutrición. Instituto Nacional de Salud Pública. Secretaría de Salud, México.
- Eskin NAM, Robinson DS. 2001. *Food Shelf Life Stability. Chemical, Biochemical, and Microbiological changes*. CRC Press, Boca Raton, Florida, USA, 370 pp.
- Eskin NAM, Przybylski R. 2001. Antioxidants and shelf life of foods. In: *Food Shelf Life Stability. Chemical, Biochemical, and Microbiological Changes*. N.A.Michaerl Eskin and David S. Robinson (Eds). Pp.175-209.
- Fisher C. 1984. Fat deposition in broilers. In: *Fats in animal nutrition*. J. Wiseman (ed). London, Butterworths. Pp 437-470.
- Franchini A, Sirri F, Tallarico N, Minelli G, Iaffaldano N, Meluzzi A. 2002. Oxidative stability and sensory and functional properties of eggs from laying hens fed supranutritional doses of vitamin E and C. *Poult Sci.* 81: 1744-1750.
- Freile PY. 2001. Algas en la botica. *Avance y Desarrollo* 20:283-292.
- Galobart J, Barroeta AC, Baucells MD, Codony R, Ternes W. 2001. Effect of dietary supplementation with rosemary extract and α -tocopheryl acetate on lipid oxidation in eggs enriched with ω 3-fatty acids. *Poult Sci* 80:460-467.
- Galobart J, Barroeta AC, Cortinas L, Baucells MD, Codony R. 2001. Accumulation of alfa-tocoferol in eggs enriched with ω 3 and ω 6 polyunsaturated fatty acids. *Poult Sci* 81:1873-1876.
- Galobart J, Barroeta AC, Baucells MD, Guardiola F. 2001. Lipid oxidation in fresh and spray-dried eggs enriched with omega3 and omega 6 polyunsaturated fatty acids during storage as affected by dietary vitamin E and canthaxanthin supplementation. *Poult Sci.* 80:327-337.
- Gamez-Meza N, Higuera-Ciapara I, Calderón de la Barca AM, Vazquez-Moreno L, Noriega-Rodríguez J, Angulo-Guerrero O. 1999. Seasonal variation in the fatty acid composition and quality of sardine oil from *Sardinops sagax caerulea* of the Gulf of California. *Lipids* 34:639-642.
- García C, Albala C. 1998. Composición lipídica de huevos de gallinas alimentadas con productos grasos y proteicos marinos. *Arch Lat Nutr.* 48:71-76.
- Goodrow EF, Wilson TA, Houde SC, Vishwanathan R, Scollin PA, Handelman G, Nicolosi RJ. 2006. Consumption of one egg per day increases serum lutein and zeaxanthin concentrations in older adults without altering serum lipid and lipoprotein cholesterol concentrations. *J Nutr.* 136:2519-2524.
- González-Esquerra R, Leeson S. 2000. Effect of feeding hens regular or deodorized menhaden oil on production parameters, yolk fatty acid profile, and sensory evaluation of eggs. *Poult Sci.* 79: 1597-1602.
- González-Esquerra R, Leeson S. 2001. Alternatives for enrichment of eggs and chicken meat with omega-3 fatty acids. *Can J Anim Sci.* 81(3):295-305.

- González-Muñoz M, Bastida S, Jiménez O, Lorenzo de C, Vergara G, Sánchez-Muñiz F. 2009. The effect of dietary fat on the fatty acid composition and cholesterol content of the eggs from Hy-line and Warren hens. *Grasas y Aceites* 60: 350-359.
- Goodfellow J. 2000. Dietary supplementation in subjects with hypercholesterolemia. *J Am Collect Cardiology* 35:265-270.
- Griffin HD, Whitehead CC. 1982. Plasma lipoprotein concentration as an indicator of fatness in broilers: development and use of a sample assay for plasma very low density lipoprotein. *Br Poult Sci* 23: 307-313.
- Grobas S, Méndez J, Lopez Bote C, De Blas C, Mateos GG. 2002. Effect of vitamin E and A supplementation on egg yolk α -tocopherol concentration. *Poult Sci* 81:376-381.
- Grune T, Krämer K, Hoppe PP, Siems W. 2001. Enrichment of eggs with n-3 polyunsaturated fatty acids: Effects of vitamin E supplementation. *Lipids* 36(8): 833-838.
- Guérin-Dubiard C, Castellani O, Anton M. 2007. Egg compounds with antioxidant and mineral binding properties. In: Huopalahati R, López-Fandiño R, Anton M, Schade R (eds.), *Bioactive Egg Compound*. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, 223-228.
- Guillén-Sans R, Guzmán-Chozas M. 1998. The thiobarbituric acid (TBA) reaction in foods: A Review. *Crit Rev Food Sci Nutr* 38(4):315-350.
- Ha YL, Storkson J, Pariza MW. 1990. Inhibition of benzo(a)pyrene induced mouse forestomach neoplasia by conjugated dienoic derivatives of linoleic acid. *Cancer Res.* 50: 1097-1101.
- Halliwel B, Aeschbach R, Lolinger J and Aruoma OA. 1995. The characterization of antioxidants. *Food Chem Toxic* 33:601-617.
- Hargis PS, Van Elswyk ME, Hargis BM. 1991. Dietary modification of yolk lipid with menhaden oil. *Poult Sci.* 70:874-883.
- Hargis PS, Van Elswyk ME. 1993. Manipulating the fatty acid composition of poultry meat and eggs for the health conscious consumer. *World's Poultry Sci J.* 49:251-264.
- Hayat Z, Cherian G, Pasha TN, Khattak FM, Jabbar MA. 2010. Oxidative stability and lipid components of eggs from flax-fed hens: effect of dietary antioxidants and storage. *Poult Sci.* 89: 1285-1292.
- Helland IB, Smith L, Saarem K, Saugstad OD, Drevon CA. 2003. Maternal supplementation with very-long-chain n3 fatty acids during pregnancy and lactation augments children's IQ at 4 years of age. *Pediatrics* 111:39-44.
- Huang YS, Liu JW. 1999. Fatty acids, Metabolism. In: Sadler M.J., Strain J.J. y Caballero B. (eds) *Encyclopedia of Human Nutrition*. Academic Press, London, pp 730-737.
- Hur SJ, Park GB, Joo SJ. 2007. Biological activities of conjugated linoleic acid (CLA) and effects of CLA on animal products. *Livestock Sci.* 110:221-229.
- INEGI. 2010. Estadísticas de Mortalidad. Instituto Nacional de Estadística, Geografía e Informática. www.inegi.org.mx/sistemas/sisept/
- Ip C. 1997. Review of the effects of trans fatty acid, oleic acid, n-3 polyunsaturated fatty acids, and conjugated linoleic acid on mammary carcinogenesis in animals. *Am J Clin Nutr* 66: 1523-1529.
- Jensen A. 1971. The nutritive value of seaweed meal for domestic animals. *Proc. Seventh Int. Seaweed Symp.* August, 1971. Sapporo, Japon. John Willey Sons. USA. Pp. 7-15.
- Jiménez-Escrig A, Goñi CI. 1999. Evaluación nutricional y efectos fisiológicos de macroalgas marinas comestibles. *Arch Lat Nut* 49(2):114-119.
- Johnson AL. 2000. Reproduction in the female. In: *Sturkie's Avian Physiology*. C. Whittow (Editor), Fifth Edition, pp. 569-596. Academic Press, USA.
- Jones S, Ma DWL, Robinson FE, Field CJ, Clandinin M. 2000. Isomers of conjugated linoleic acid (CLA) are incorporated into egg yolk lipids by CLA-fed laying hens. *J Nutr* 130:2002-2005.
- Juárez-Torres M, Flores EML, Luna MJ. 2007. El Sector pesquero en México. Documento interno de trabajo de Financiera Rural. México, D.F. 45 pp.
- Klasing K. 1998. *Comparative Avian Nutrition*, CAB International, Cambridge, U.K.
- Kralik G, Gajcevic Z, Skrtic Z. 2008. The effect of different oil supplementations on laying performance and fatty acid composition of egg yolk. *Ital J Anim Sci* 7, 173-183.
- Kris-Etherton PM, Harris WS, Appel LJ. 2002. Fish consumption, fish oil, omega-3 fatty acids, and cardiovascular disease. *Circulation* 106:2747-2757.

- Lee JY, Hwang DH. 2008. Dietary fatty acids and eicosanoids. In: Fatty Acids in Foods and their Health Implications. Ching Kuang Chow (editor). pp.713-726. Third edition. CRC Press, Boca Raton, Fla, USA.
- Leeson, S, Caston L, Maclaurin T. 1998. Organoleptic evaluation of eggs produced by laying hens fed diets containing graded levels of flaxseed and vitamin E. *Poult Sci* 77:1436-1440.
- Legrand P, Catheline D, Fichot MC, Lemarchal P. 1997. Inhibiting Δ -9 desaturase activity impairs triacylglycerol secretion in cultured chicken hepatocytes. *J Nutr* 127:249-256.
- Lobb K, Chow CK. 2008. Fatty Acid Classification and Nomenclature. In: Fatty Acids in Foods and Their Health Implications. pp.1-15. Ching Kuang Chow (editor). Third edition. CRC Press, Boca Raton, Fla, USA.
- Makride M, Hawkes JS, Neumann MA, Gibson RA. 2002. Nutritional effect of including egg yolk in the weaning diet of breast-fed and formula-fed infants: a randomized controlled trial. *Am J Clin Nutr* 75:1084-1092.
- Mataix J, Gil A. 2004. Libro Blanco de los omega-3. Editorial Médica Panamericana. Zaragoza, España. Pp 9, 10, 15-18.
- Matanjun P, Mohamed S, Mustapha NM, Muhammad K, Ming CH. 2008. Antioxidant activities and phenolics content of eight species of seaweeds from north Borneo. *J Appl Phycol* 20:367-373.
- Matsukawa R, Dubinsky Z, Kishimoto E, Masakki K, Masuda Y. and Takeuchi T. 1997. A comparison of screening methods for antioxidant activity in seaweeds. *J. Appl. Phycol* 9:29-35.
- Maurice DV. 1994. Dietary fish oils. Feeding to produce designer eggs. *Feed Management* 45: 29-32.
- Meister K. 2002. The role of eggs in the diet: Update. American Council on Science and Health. New York, USA. 29 pp.
- Mohiti-Asli M, Shariatmadari F, Lotfollahian H, Taghi Mazuji M. 2008. Effects of supplementing layer hen diets with selenium and vitamin E on egg quality, lipid oxidation and fatty acid composition during storage. *Can J Anim Sci.*88:475-483.
- Moral-Simanek RJ del, Vaca-Rodríguez JG, Alcalá Alvarez MC. 2010. Análisis socioeconómico e interrelación de las pesquerías de sardina y atún aleta azul en la región noroeste de México. *Región y Sociedad* 22 (47): 9-29.
- Motta C., Gueux E., Mazur A. y Rayssiguier Y. 1996. Lipid fluidity of triacylglycerol-rich lipoproteins isolated from copper-deficient rats. *Br J Nutr* 75(5): 767-773.
- Murray RK, Granner DK, Mayers PP. 2004. VW Harper. *Bioquímica Ilustrada*. Medina S.C.A y Boyd F.A.R (Editores). 26ª Edición. Editorial Manual Moderno. México, D.F. 713 p.
- Nakamura T, Nagayakama K and Kawaguchi S. 1994. High tocopherol content in a brown alga *Ishige okamurae*. *Fish Sci.* 60:793-794.
- Nakamura T, Nagayakama K, Udrida K, Tanaka R. 1996. Antioxidant activity of phlorotannins from the brown alga *Eisenia bicyclis*. *Fish Sci.* 62:923-926.
- Nelson DL, Cox MM. 2004. *Lehninger Principles of Biochemistry*. 4th Edition. W.H. Freeman and Company. New York. 1100p.
- Pariza M, Ha Y. 1990. Conjugated dienoic derivatives of linoleic acid a new class of anticarcinogens. *Med Oncol Tumor Pharmacother* 7: 169-171.
- Place AR. 1996. Birds and lipids: Living off the fat of the earth. *Poul Avian Biol Rev* 7: 127-141.
- Qasim R, Barkati S. 1985. Ascorbic acid and dehydroascorbic acid contents of marine algal species from Karachi. *Pakistan J Sci Ind Res* 28: 129-133.
- Qi GH, Sim JS 1998. Natural tocopherol enrichment and its effect in n-3 fatty acid modified chicken eggs. *J Agric Food Chem* 46: 1920-1926.
- Ragan MA, Craig JS. 1973. Phenolic compounds in brown and red algae. In: *Handbook of Phycological Methods. Physiological and biochemical methods*. Edited by J.A. Hellebust & JS Craig. 157-179.
- Ramarathanam N, Osawa T, Ochi H, Kawakishis T. 1995. The contribution of plant food antioxidant to human health. *Trends Food Sci Tech.* 6:75-82.
- Ramsden C, Mann JD, Faurot KR, Lynch C, Imam ST, Macintosh BA, Hibbeln JR, Loewke J, Smith S, Coble R, Suchindran C, Gaylord SA. 2011. Low omega-6 vs low omega-6 plus high omega-3 dietary intervention for chronic daily headache: protocol for a randomized clinical trial. *Trials* 12:97.
- Rice R. 1999. Fish Nutritional Value. In: *Encyclopedia of Human Nutrition*. MJ Sadler, JJ Strain, B Caballero (eds). Volume II. Pp. 793-803 pp. Academic Press.

- Rojkind AR de. 1977. Algas marinas bentónicas como suplemento en la alimentación animal. 1. Ensayos con pollos y gallinas ponedoras. Revisión bibliográfica. Centro de Investigación de Biología Marina. Estación Puerto Deseado, Estación Austral. Contribución técnica No. 19. Buenos Aires, Argentina. 23 pp.
- Sánchez-Moreno C, Larrauri JA. 1998. Principales métodos para la determinación de la oxidación lipídica. *Food Sci Tech Int* 4 (6): 391-399.
- Sanhueza C, Nieto K, Valenzuela B. 2002. Ácido linoleico conjugado: un ácido graso con isomería *trans* potencialmente beneficioso. *Rev Chil Nutr* 29, 98-105.
- Seuss-Baum I. 2007. Nutritional evaluation of egg compounds. In: *Bioactive Egg Compounds*. Rainer Huopalahti, Rosina López-Fandiño, Marc Anton and Rüdiger Schade (editors), pp.117-140. Springer-Verlag Berlin Heidelberg.
- Shang XG, Wang FL, Li DF, Yin JD, Li JY. 2004. Effects of conjugated linoleic acid on the productivity of laying hens and egg quality during refrigerated storage. *Poult Sci* 83, 1688-1695.
- Simopoulos AP. 2000. Human requirement for n-3 polyunsaturated fatty acids. *Poult. Sci.* 79:961-970.
- Simopoulos AP. 2008. The importance of the omega-6/omega-3 fatty acid ratio in cardiovascular disease and other chronic diseases. *Exp Biol Med* 233:674-688.
- Solibami VJ and Kamat SY. 1985. Distribution of tocopherol (Vitamin E) in marine algae from Goa, West Coast of India. *Indian J Mar Sci.* 14:228-229.
- Stak, K.D. 2000. Effects of Fish-Oil Concentrate in Postmenopausal Women Receiving and not Receiving Hormone Replacement Therapy in Placebo-Controlled, Double-Blind Trial. *Am J Clin Nutr* 72: 389-394.
- Suksombat W, Samitayotin S, Lounglawan P. 2006. Effects of conjugated linoleic acid supplementation in layer diet on fatty acid compositions of egg yolk and layer performances. *Poult Sci* 85, 1603-1609.
- Surai P. 2003. *Natural antioxidants in avian nutrition and reproduction*. Nottingham University Press, England, UK.
- Surai PF, MacPherson A, Speake BK, Sparks NHC. 2000. Designer egg evaluation in a controlled trial. *Eur J Clin Nutr* 54:298-305.
- Surai PF, Sparks NHC. 2001. Designer eggs: from improvement of egg composition to functional food. *Trends in Food Sci. Tech.* 12:7-16.
- Turnbull WH. 1999. Egg Nutritional Value. In: *Encyclopedia of Human Nutrition*. MJ Sadler, JJ Strain and B Caballero (eds). Academic Press. London. Pp. 631-634.
- UNA. 2012. *Compendio de Indicadores Económicos del Sector Avícola*. Unión Nacional de Avicultores. Dirección de Estudios Económicos. México D.F.
- Welch VA, Borlakoglu JT. 1982. Absorption and transport of dietary lipid: Effect on some lipid-related health problems. In: *Fatty acids in foods and their health implications*. Ed. By C. Kuang. Marcel Dekker, Inc. New York. pp: 559-612.
- Wheatley RA. 2000. Some trends and the analytical chemistry of lipid peroxidation. *Trends Anal Chem* 19(10): 617-628.
- Wiseman J, Salvador F, Craigon J. 1991. Prediction of the apparent metabolizable energy content of fats fed to broiler chickens. *Poult Sci* 70: 1527-1533.
- Wong DWS. 1989. *Química de los Alimentos*. Ed. Acribia, Zaragoza España. pp. 2-12, 405-407, 415-419.
- Yalcyn H, Unal MK, Basmacyoolu H. 2007. The fatty acid and cholesterol composition of enriched egg yolk lipids obtained by modifying hens diets with fish oil and flaxseed. *Grasas y Aceites* 58: 372-378.
- Yan X, Chuda Y, Susuki M, Nagata T. 1999. Fucoxanthin as the major antioxidant in *Hijikia fusiformis*, a common edible seaweed. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 63:605-607.
- Yannakopoulos A. 2007. Egg enrichment in omega-3 fatty acids. In: *Bioactive Egg Compounds*. Rainer H, R López-Fandiño, M Anton, R Schade (eds). Springer-Verlag Berlin Heidelberg, Pp 159-170.
- Yuan YV. 2008. Marine algal constituents. In: *Marine Nutraceuticals and Functional Foods*. C. Barrow and F. Shahidi (eds). pp 259-296. CRC Press, Boca Raton, Florida, USA.
- Zeidler G. 2002. Shell Eggs and their Nutritional Value. In: *Commercial Chicken Meat and Egg Production* Bell. D. D., Weaver D. W.(eds) 5th edition Editorial Kluwer Academic Publishers. United States of America. pp 1109-1128.
- Páginas de internet consultadas: <http://www.iffonet.net>, <http://www.huevo.org.es>, http://www.conabio.gob.mx/institucion/estudio_pais/CAP3.PDF

IV. Objetivo General

Determinar si la vitamina E, las algas marinas *Sargassum* spp y el ácido linoleico conjugado (CLA) incrementan la estabilidad oxidativa en el huevo para plato, cuando éste ha sido enriquecido con ácidos grasos omega 3 (AGn3), a través del aceite de sardina.

Objetivos particulares

- 1) Aumentar la concentración de AGn3 en el huevo para plato, suplementando la dieta para gallinas ponedoras con aceite de sardina, sin afectar en forma alguna las variables productivas de las aves, color de la yema, y las características sensoriales del huevo; así como, determinar si la oxidación lipídica en este huevo enriquecido con AGn3 aumenta al conservar el huevo durante varios días a temperatura ambiente.
- 2) Determinar el efecto que sobre las variables productivas de las aves, color de la yema, composición en ácidos grasos y características sensoriales del huevo tiene suplementar la dieta para gallinas ponedoras con aceite de sardina junto con vitamina E y si esta combinación reduce la oxidación lipídica en el huevo enriquecido con AGn3, cuando éste es conservado durante varios días a temperatura ambiente.
- 3) Determinar el efecto que sobre las variables productivas de las aves, color de la yema, composición en ácidos grasos y características sensoriales del huevo tiene suplementar la dieta para gallinas ponedoras con aceite de sardina junto con algas marinas *Sargassum* spp y si esta combinación reduce la oxidación lipídica en el huevo enriquecido con AGn3, cuando éste es conservado durante varios días a temperatura ambiente.
- 4) Determinar el efecto que sobre las variables productivas de las aves, color de la yema, composición en ácidos grasos y características sensoriales del huevo tiene suplementar la dieta para gallinas ponedoras con aceite de sardina junto con CLA, y si esta combinación reduce la oxidación lipídica en el huevo enriquecido con AGn3, cuando éste es conservado durante varios días a temperatura ambiente.

V. Hipótesis

- 1) Al suplementar la dieta para gallinas ponedoras con aceite de sardina, la concentración de AGn3 en el huevo para plato aumenta, afectando las variables productivas de las aves, el color de la yema, las características sensoriales del huevo ocasionando un aumento en la oxidación lipídica del huevo al conservarlo durante varios días a temperatura ambiente.
- 2) Al suplementar la dieta para gallinas ponedoras con aceite de sardina junto con vitamina E, las variables productivas de las aves, color de la yema y las características sensoriales del huevo no se ven afectadas en forma alguna; la concentración de AGn3 en el huevo se incrementa y la oxidación lipídica en el mismo se ve reducida cuando este sea conservado durante varios días a temperatura ambiente.
- 3) Al suplementar la dieta para gallinas ponedoras con aceite de sardina junto con algas marinas *Sargassum*, las variables productivas de las aves, color de la yema y las características sensoriales del huevo no se ven afectadas en forma alguna; la concentración de AGn3 en el huevo se incrementa, y la oxidación lipídica en el mismo se ve reducida cuando éste es conservado durante varios días a temperatura ambiente.
- 4) Al suplementar la dieta para gallinas ponedoras con aceite de sardina junto con CLA, las variables productivas de las aves, color de la yema y las características sensoriales del huevo no se ven afectadas en forma alguna; la concentración de AGn3 en el huevo se incrementa y la oxidación lipídica en el mismo se ve reducida cuando éste es conservado durante varios días a temperatura ambiente.

NOTA EXPLICATIVA

Cada una de las hipótesis será respondida en uno de cuatro artículos siguientes de la sección VI, en cada uno se presentan los materiales y métodos, resultados y discusión correspondientes.

Los artículos que aparecen en la sección VII ya fueron publicados y corresponden a ensayos realizados en una primera etapa.

6.1 Composición en ácidos grasos, características sensoriales y estabilidad oxidativa del huevo al suplementar la dieta para gallinas ponedoras con **aceite de sardina**

Composición en ácidos grasos, características sensoriales y estabilidad oxidativa del huevo al suplementar la dieta para gallinas ponedoras con aceite de sardina

Resumen

Con el objetivo de determinar si la composición en ácidos grasos, características sensoriales y la estabilidad oxidativa del huevo se ve afectada al suplementar la dieta para gallinas ponedoras con aceite de sardina, se condujo un ensayo en el que se utilizaron 60 gallinas Bovans White de 75 semanas de edad, con 5 réplicas de 12 aves cada una, constituyendo cada réplica la unidad experimental. A cada grupo de gallinas le fue asignada aleatoriamente una dieta sin aceite de sardina (AS) u otra con 2.5% de AS. El ensayo tuvo una duración de 4 semanas, con una semana previa de acostumbramiento. Agua y alimento fueron suministrados *ad libitum*. Al final del periodo experimental se midieron las variables productivas y la calidad física del huevo. Se evaluó sensorialmente el sabor del huevo. La concentración de ácidos grasos (AG) en el huevo y el grado de oxidación de los mismos se midió a los 0, 30 y 60 días de almacenamiento a temperatura ambiente (20 C). Los resultados mostraron una reducción en la producción (84 vs 77%) y masa del huevo (57 vs 52g) al suplementar la dieta con 2.5%AS ($P < 0.05$), y un incremento en la coloración de la yema ($P < 0.05$) (9 vs 10 abanico Roche). El sabor del huevo no se vio afectado ($P > 0.05$). La concentración de los ácidos grasos n3 (AGn3) en el huevo, principalmente del eicosapentaenoico (EPA) y del docosahexaenoico (DHA), aumentó significativamente al suplementar la dieta con AS (1.6 vs 4.3 % del total de ácidos grasos) mientras que la relación n6:n3 se redujo significativamente (11.4 vs 2.4) ($P < 0.05$); estos valores se mantuvieron constantes durante los 60 días de almacenamiento ($P < 0.05$). El grado de oxidación (nmol de malonaldehído/mL de muestra) en el huevo aumentó ($P < 0.05$) con la adición de AS en la dieta (1.21 vs 1.61) y con el tiempo de almacenamiento (1.21, 1.59 en el grupo testigo; 1.61, 1.93 en el tratamiento con AS, a los 0 y 30 d de almacenamiento, respectivamente). A los 60 d de almacenamiento la concentración de MDA se redujo significativamente en ambos tratamientos ($P < 0.05$). Se concluye que el aceite de sardina es una alternativa para enriquecer el huevo con ácidos grasos omega 3 y reducir la relación n6:n3 en el mismo, lográndose mantener esta situación aun hasta por 60 días de almacenamiento a temperatura ambiente (20°C). Es posible que los antioxidantes propios del ave, presentes en el huevo contribuyan a proteger a estos AG por la importancia fisiológica que estos tienen para el ave, y que los compuestos oxidados detectados desde el primer día de almacenamiento en ambos tratamientos hayan sido otros. Aun así, se sugiere adicionar antioxidante tanto al aceite como a las dietas para reducir el riesgo de oxidación tanto lipídica como de otros compuestos en el huevo.

Palabras clave: aceite de sardina, ácidos grasos omega 3, estabilidad oxidativa, gallinas, huevo

Introducción

Los resultados de varios estudios epidemiológicos en humanos y animales demuestran que los ácidos grasos omega 3 (AGn3), principalmente los ácidos eicosapentaenoico (EPA) y docosahexaenoico (DHA), no solo son esenciales para el desarrollo del cerebro y la retina, también son de gran utilidad en la prevención y control de las enfermedades cardiovasculares, ciertos tipos de cáncer y diabetes tipo 2; fortalecen el sistema inmunológico, aumentan el coeficiente intelectual en infantes y tienen un efecto positivo en niños con problemas de déficit de atención (Burgess et al. 2000; Stak, 2000; Goodfellow, 2000; Kris-Etherton et al. 2002; Helland et al. 2003; Chow, 2008; Simopoulos, 2008).

El EPA y DHA se encuentran principalmente en los productos marinos (peces, crustáceos, etc.) pero en México, al igual que en otros países, el consumo de los productos marinos es muy bajo (10.4 kg *per capita* anual)(CONAPESCA,2010); mientras que el de los productos avícolas, como el huevo, es elevado (22.8 kg *per capita* anual) (UNA, 2012).

El huevo es uno de los alimentos de mayor consumo por su excelente valor nutritivo, por su precio que lo hace asequible a toda la población, por su versatilidad para ser preparado en muy diferentes formas, y es un importante ingrediente en la industria de los alimentos. Por ésta, y muchas otras razones más, el huevo es empleado actualmente como un vehículo para hacer llegar a los consumidores nutrimentos tan importantes para la salud como son los AGn3.

Por tal motivo, y con la finalidad de producir huevos con un alto contenido de EPA y DHA, los aceites marinos (principalmente de menhaden, atún y sardina) han sido frecuentemente empleados en la alimentación de las aves, ya que poseen altas concentraciones de estos ácidos grasos (Hargis y Van Elswyk, 1993; García y Albalá, 1998; González-Esquerra y Leeson, 2001; Surai y Sparks, 2001; Castillo-Badillo et al. 2005; Carrillo et al. 2005; Yalcyn et al. 2007; Yannakopoulos, 2007; Cornejo et al. 2008; Kralik et al. 2008). Sin embargo, esta misma característica hace a los aceites de pescado altamente susceptibles a la oxidación lipídica, una de las principales vías de deterioro de los alimentos que, por lo general, deriva en una pérdida de la calidad comercial, organoléptica y sanitaria del alimento (Bailey, 1984; Eskin y Robinson, 2001).

Diversos estudios (Hargis y Van Elswyk, 1993; Maurice, 1994; Cloughley et al. 1997; González-Esquerra y Leeson, 2001; Surai y Spark, 2001) señalan la conveniencia de emplear niveles inferiores al 1.5% de aceite de pescado en la dieta de las aves, y otros como Cherian (2007) mencionan como límite un 3% a fin de no afectar negativamente el sabor del huevo ni otras características como la producción y peso del mismo y reducir en lo posible el riesgo de una oxidación lipídica.

Por otra parte, la información referente a los efectos que tiene el tiempo de almacenamiento sobre la concentración de los AGn3 en el huevo, principalmente cuando se han empleado ingredientes en la dieta para incrementar dicha concentración, es muy escasa y algunas veces contradictoria (Van Elswyk et al. 2002; Oku et al. 1996; Yannakopoulos, 2007).

Por tanto, el objetivo de este estudio fue determinar si la composición en ácidos grasos, características sensoriales y estabilidad oxidativa del huevo se ve afectada al suplementar la dieta para gallinas ponedoras con 2.5% de aceite de sardina y al mantener el huevo almacenado por un periodo de 60 días a temperatura ambiente.

Materiales y Métodos

Obtención del aceite de pescado

El aceite de sardina (AS) empleado en el estudio se obtuvo en una planta procesadora de harinas de pescado en Guaymas, Sonora, México. Estaba estabilizado con 200 ppm de butilhidroxitolueno (BHT), pero no estaba deodorizado, refinado ni blanqueado. Se mantuvo en refrigeración y en oscuridad hasta el momento de ser utilizado.

Formulación y preparación de las dietas

La dieta base se formuló con el programa Nutrion WindowsTM (Versión 5.0 Pro), cubriendo las necesidades nutrimentales establecidas por el National Research Council (NRC 1994) para gallinas ponedoras, con 15% de proteína cruda y 2785 kcal de energía metabolizable. Fue elaborada con base sorgo-soya y sin antioxidante. Esta dieta fungió como testigo (T1), mientras que la dieta experimental (T2) fue suplementada con 2.5% de aceite de sardina (AS), en sustitución del aceite de soya (Cuadro 6).

Cuadro 6. Composición porcentual de la dieta base

Ingrediente	kg
Sorgo grano	61.8
Pasta de soya	20.4
Carbonato de calcio	12.4
Aceite de soya	2.50
Ortofosfato 1820 ¹	1.55
Sal (NaCl)	0.45
L-Lisina HCL	0.35
Avelut polvo 15 ²	0.10
Toxisorb	0.10
Alimet 88%	0.08
Avired ³	0.08
Premezcla mineral ⁴	0.05
Cloruro de colina 60	0.05
Premezcla vitamínica ⁵	0.05
Bacitracina	0.03
L-treonina	0.03
Antioxidante	0.00
Total	100.02
Aporte calculado	
Energía Metabolizable (Mcal/kg)	2.75
Proteína cruda %	15.32
Metionina %	0.33
Met + Cis %	0.58
Lisina %	1.02
Treonina	0.63
Calcio total %	4.85
Fósforo disponible %	0.41
Sodio %	0.18
Cloro %	0.40
Colina mg/kg	1260.69

¹ Fosfato monobásico P 21% min, Ca 18% min, F 0.21% max, humedad 5% max.

² Fuente natural de xantófilas amarillas (Flor de cempasúchitl) 15 g/kg

³ Pigmento vegetal rojo: Lucantin Red como fuente de cantaxantina, 5 g carotenoides total /kg

⁴ Minerales (mg/kg dieta): Mn 120; Zn 100; Fe 120; Cu 12; I 0.7; Se 0.4; Co 0.2; excipiente, c.b.p. 1 000

⁵ Vitaminas (por kg): A, 10 000 000 IU; D₃, 3 000 000 IU; E, 20 000 IU; K₃, 2.500 g; Tiamina, 2.500 g; Riboflavina, 5 g; Niacina, 35 g; Acido pantotenico, 10 g; Piridoxina, 4 g; Acido folico, 1 g; Cianocobalamina, 10 mg; Biotina, 200 mg; excipiente cbp 1 000.

Las dietas se prepararon cada semana, primero en una mezcladora de gusano sinfín con capacidad para 120 kg/5 minutos, y posteriormente en una mezcladora de listón (Howes Co Inc model 152 M) por 3 minutos a 75 rpm.

Análisis de la composición de ácidos grasos en los aceites y dietas

En el caso de las dietas y de los aceites, previo al análisis de ácidos grasos, se hizo una extracción de lípidos con cloroformo:etanol (1:1) (AOAC 2000, método 923.07). El extracto lipídico de las dietas y de los aceites, fue metilado con trifluoruro de boro al 20% en una solución metanólica al 2% (AOAC 2000, método 969.33). Las muestras se inyectaron en un cromatógrafo de gases Varian, modelo 3380 CX equipado con un automuestreador CP8400, detector de ionización de flama y columna DB23 de 30 m con un d.i. de 0.25mm. Se utilizó al nitrógeno como gas acarreador a un flujo de 30 mL/min. Las temperaturas utilizadas fueron: columna 230°C, inyector 150°C, detector 300°C. Para calcular la concentración de ácidos grasos se utilizó como patrón de referencia una mezcla de estándares de ácidos grasos con concentraciones conocidas (SupelcoTM 37 FAME Mix SIGMA). El ácido miristoleico fue utilizado como estándar interno. La integración de los resultados se hizo mediante el programa Star Chromatography Workstation vs 6.3 Varian Associates, Inc. Los resultados se reportan en porciento del total de ácidos grasos (%TAG) (Cuadro 7).

Medición de las variables productivas

El ensayo experimental con las aves tuvo lugar en el Centro Experimental de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia (UNAM), ubicado en Santiago, Zapotitlán, Delegación Tlahuac, Distrito Federal. El clima de la región es templado subhúmedo, con una precipitación anual de 747 mm, siendo enero el mes mas frío y mayo el más caluroso. Para cada tratamiento se utilizaron 60 gallinas Bovans White de 75 semanas de edad, con 5 réplicas de 12 aves cada una, constituyendo cada réplica la unidad experimental. A cada grupo de gallinas le fue asignada aleatoriamente una de las dietas experimentales. El ensayo tuvo una duración de 4 semanas, con una semana previa de acostumbramiento y un

Cuadro 7. Composición en ácidos grasos de los aceites y las dietas

Acido graso (% TAG)	Aceite de Soya	Aceite de Sardina	Dieta Testigo	Dieta Experimental
Mirístico (C14:0)	0.11	6.09	0.24	3.46
Palmítico (C16:0)	10.77	18.54	13.03	17.01
Heptadecanoico (C17:0)	0.10	0.56	0.12	0.35
Esteárico (C18:0)	4.22	3.82	3.86	3.27
Araquídico (C20:0)	0.31	0.29	0.26	0.22
Total AGS	15.58	29.42	17.76	24.49
Pentadecanoico (C15:1)	0.00	0.51	0.04	0.31
Palmitoleico (C16:1)	0.18	7.47	0.44	4.11
cis10-heptadecenoico (C17:1)	0.07	0.99	0.07	0.29
Oleico (C18:1)	21.91	12.2	27.78	20.41
cis-vaccénico (C18:1)	0.83	3.06	0.72	2.23
Eicosenoico (C20:1)	0.22	0.22	0.28	1.32
Erúcico (C22:1)	0.05	0.22	0.1	0.16
Total AGM	23.33	24.91	29.51	28.92
Linoleico (C18:2 n6)	53.23	1.37	43.71	20.36
CLA c9,t11 y c11,t9 (C18:2)	0.03	2.55	0.00	1.33
CLA t10,c12 (C18:2)	0.00	0.29	0.00	0.09
γ-linolénico (C18:3 n6)	0.06	0.31	0.00	0.14
α-linolénico (C18:3 n3)	6.95	0.99	4.54	1.60
cis-11,14-eicosadienoico (C20:2)	0.05	0.25	0.04	0.11
cis-11,14,17-eicosatrienoico (C20:3)	0.10	0.18	0.04	0.06
cis-8,11,14-eicatrienoico (C20:3)	0.00	0.22	0.04	0.23
Araquidónico (C20:4 n6)	0.00	0.75	0.19	0.45
Eicosapentaenoico (C20:5 n3)	0.40	14.2	0.28	8.05
Docosapentaenoico (C22:5 n3)	0.00	1.57	0.00	1.08
Docosapentaenoico (C22:5 n6)	nd	Nd	0.00	0.16
Docosahexaenoico (C22:6 n3)	0.04	10.26	0.07	6.11
Total AGPI	60.9	32.94	48.92	39.94
Total n6	53.29	2.43	43.9	21.12
Total n3	7.39	27.02	4.90	16.83
n6:n3	7.21	0.09	8.96	1.25
Lípidos totales (g/100g muestra)			4.35	4.25

El total de estos valores no da 100% porque ácidos grasos menores no están reportados.

TAG– Total de ácidos grasos AGS – Ácidos grasos saturados, AGM- Ácidos grasos monoinsaturados, AGPI- Ácidos grasos poliinsaturados

programa de 16 horas de luz. Agua y alimento fueron suministrados *ad libitum*. Se llevó un Registro diario del consumo de alimento, producción de huevo y peso del huevo. Al final de cada semana se hizo un resumen semanal de las variables antes mencionadas, así como, de la masa de huevo y conversión alimenticia.

El estudio se condujo en conformidad con las políticas establecidas por el Comité de Ética para el Cuidado de los Animales, de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Nacional Autónoma de México.

Evaluación del color de la yema con el Abanico Roche

Al final de la cuarta semana de experimentación se tomaron al azar 25 huevos de cada tratamiento (5 por réplica) para medir el color de la yema, de acuerdo a los valores del abanico colorimétrico Roche, cuyos valores van del 1 al 15, correspondiendo el número 1 a un color amarillo muy pálido y el 15 a un amarillo-naranja muy intenso.

Evaluación sensorial del huevo

Al final de las cuatro semanas de experimentación, se realizó una prueba de evaluación sensorial en cabinas individuales en el Laboratorio de Evaluación Sensorial del Depto. de Ciencia y Tecnología de los Alimentos del INCMNSZ. Se aplicó una prueba afectiva para medir el grado de aceptación por el sabor del huevo y el color de la yema (Anzaldúa-Morales, 1994). En los dos casos se utilizó una escala ordinal de cinco puntos. Participaron 30 jueces no entrenados, de ambos sexos, consumidores habituales de huevo.

a) Sabor del huevo

De cada tratamiento se tomaron al azar 8 huevos, se revolviaron y frieron en una sartén con aceite en aerosol (PAM^{MR}). En ninguno de los casos se adicionó sal u otro sazoador. A cada tratamiento se le asignó una clave de tres dígitos, tomados de una tabla de números aleatorios (Meilgaard et al. 1999).

En una charola, se colocó un plato con las diferentes muestras de huevo revuelto, junto con una pieza de pan blanco y un vaso de agua (que entre muestra y muestra debería consumir el panelista a fin de eliminar sabores residuales) y un cuestionario para indicar el

grado de aceptación para cada una de las muestras. Dentro de la cabina se utilizó luz roja para evitar que el panelista se dejará influir por el color del huevo al evaluar el sabor del mismo.

b) Color de la yema

Se tomó un huevo de cada tratamiento, cada yema se colocó en recipientes de plástico transparente sobre un fondo blanco, asignando a cada yema una clave de tres dígitos (diferente a la empleada en la evaluación del sabor), tomados de una tabla de números aleatorios (Meilgaard et al. 1999).

A cada panelista se le entregaba una charola con las yemas de los diferentes tratamientos a evaluar. Junto con ello se les daba un cuestionario donde indicaban el grado de aceptación por el color de la yema de cada tratamiento, de acuerdo a la escala de cinco puntos que ahí se señalaban. Dentro de la cabina se utilizó luz blanca.

Se cerró la ventanilla de la cabina (para permitir la concentración del panelista) y se esperó la señal (luz de color rojo) que indicaba que había concluido su evaluación. En ese momento se abría la ventanilla para recoger los cuestionarios.

Análisis de la composición en ácidos grasos del huevo

Al final de la cuarta semana de experimentación se tomaron al azar 30 huevos de cada tratamiento (6 por réplica). 10 de ellos se mezclaron con una batidora para formar un “pool”, de allí se tomaron 10 alícuotas de 1 g para realizar la extracción lipídica con cloroformo:etanol (1:1) (AOAC 2000, método 923.07) y metilar los ácidos grasos con trifluoruro de boro al 20% en una solución metanólica al 2% (AOAC 2000, método 969.33) (Anexos 10.3 y 10.4). Las 20 piezas restantes de cada tratamiento, se conservaron a temperatura ambiente (20°C), para efectuar estos mismos análisis a los 30 y 60 días siguientes. Las muestras se inyectaron en un cromatógrafo de gases Varian, modelo 3380 CX equipado con un automuestreador CP8400, detector de ionización de flama y columna DB23 de 30 m con un d.i. de 0.25mm.

Determinación de la oxidación lipídica mediante la prueba de TBARS

En la cuarta semana de experimentación se tomaron de cada tratamiento 30 huevos. Al siguiente día, después de la recolección, a 10 de ellos se les determinó el grado de oxidación lipídica en yema, utilizando el método del ácido tiobarbitúrico (TBARS) (Salih et al. 1987; Botsoglou et al. 1994), cuantificando la concentración de malondialdehído (MDA) en la yema. Las 20 piezas restantes se conservaron a temperatura ambiente (20°C), para efectuar el mismo análisis (n=10) a los 30 y 60 días siguientes.

Diseño Experimental del Estudio

El estudio fue prospectivo, comparativo y experimental. El modelo estadístico utilizado para las variables productivas y el color de la yema fue conforme a un diseño completamente al azar, siendo el siguiente:

$$Y_{ij} = \mu + T_i + \xi_{ij} \quad \text{donde:}$$

Y_{ij} = Valor de la variable de respuesta en el tratamiento i , repetición j .

μ = media general

T_i = Efecto del tratamiento i .

ξ_{ij} = Error experimental del i -ésimo tratamiento de la j -ésima repetición.

El diseño empleado para la concentración de lípidos totales, ácidos grasos y malonaldehído (MDA) en el huevo, fue uno completamente al azar, con arreglo factorial 2x3, donde los factores a considerar fueron la dieta (testigo y experimental) y el tiempo de conservación del huevo (0, 30 y 60 d) a temperatura ambiente. El modelo estadístico asociado a este diseño fue el siguiente:

$$Y_{ijk} = \mu + A_i + B_j + A_i * B_j + \xi_{ijk}$$

donde:

Y_{ijk} = Variable de respuesta debido al efecto de la dieta y el tiempo de conservación

μ = media general

A_i = Efecto de la i -ésima dieta

B_j = Efecto del j -ésimo tiempo de conservación

$A_i * B_j$ = Interacción entre la dieta y el tiempo de conservación

ξ_{ijk} = Error experimental del i -ésimo tratamiento de la j -ésima repetición.

Análisis estadístico

Los datos de las variables productivas y el color de la yema (medido con el abanico Roche) se analizaron mediante la prueba t de Student ($P < 0.05$).

Los datos obtenidos en la prueba de evaluación sensorial se analizaron mediante la prueba no paramétrica de rangos de Wilcoxon con una significancia de 0.05 (SAS, 2008).

Los datos de las variables concentración de lípidos totales, ácidos grasos y MDA en huevo se analizaron conforme a un diseño completamente al azar con arreglo factorial 2x3, siendo un factor la dieta y el otro el tiempo. Se utilizó el PROC GLM de SAS (SAS, 2008) para el análisis de los datos. La comparación entre medias se hizo con la prueba de Tukey ($P < 0.05$).

Resultados

Aceite de soya

Los AG que predominaron en este aceite fueron los poliinsaturados (AGPI), seguidos por los monoinsaturados (AGM) y por último los saturados (AGS) (61%, 23% y 16% respectivamente) (Cuadro 7).

Del total de los AGPI, el ácido linoleico (C18:2 n6 LA) aportó un 87% y el α -linolénico (C18:3 n3 ALA) 11%; mientras que del total de AGM, el oleico (C18:1 n9) contribuyó con un 94%. En el caso de los AGS, el palmítico (C16:0) constituyó casi el 70% del total y el esteárico 25%. Predominaron en este aceite, los n6 mas que los n3 (53% vs 7%).

Aceite de sardina

La composición en AG de este aceite difiere considerablemente del aceite de soya. Aunque también predominaron los AGPI, los AGS son los que ocuparon el segundo lugar y los AGM el último (45%, 29% y 25%, respectivamente) (Cuadro 7).

Contrario a lo que sucede en el aceite de soya, en el de sardina predominan los n3 mas que los n6 (27% vs 15%), siendo el EPA y DHA, los AGn3 representativos de este aceite. También, a diferencia del aceite de soya, en el aceite de pescado se detectó la presencia del ácido linoleico conjugado (6.3% del total de AGPI).

Composición de las dietas

En la dieta testigo (T1), predominaron los AGPI, seguidos por los AGM y los AGS (49%, 29% y 18%, respectivamente) (Cuadro 7). Del total de AGPI, el LA conformó la mayor parte (90%). En el caso de los AGM, el oleico constituyó el 94% del total, mientras que del total de AGS el palmítico contribuyó con 73%. En esta dieta predominaron los AGn6, manteniendo una relación n6:n3 de 9:1. No se detectó la presencia de docosapentaenoico (C22:5 n3 y n6 DPA), y solo trazas de araquidónico (C20:4 n6 AA), EPA y DHA.

La dieta que incluía 2.5% de aceite de sardina (DT+2.5%AS) presentó una concentración de 40% de AGPI, 29% de AGM y 25% de AGS. Del total de AGPI, el LA constituyó el 50%, el resto estuvo conformado por el EPA (20%) y el DHA (15%), principalmente. En esta dieta la relación n6:n3 fue de 1.2:1.

Variables productivas

Suplementar las dietas con el aceite de sardina redujo significativamente la producción de huevo en un 7% ($P < 0.05$), así como la masa de huevo, siendo en este caso la reducción de 5.2 g ($P < 0.05$). La conversión alimenticia fue afectada en forma negativa cuando la dieta se suplementó con AS. Por lo contrario, la coloración de la yema, se vio favorecida, pasando de un valor de 9 a 10 de la escala colorimétrica Roche ($P < 0.05$). El consumo de alimento y el peso del huevo no resultaron afectados ($P > 0.05$) (Cuadro 8).

Cuadro 8. Variables productivas y color de la yema obtenidos al suplementar la dieta para gallinas ponedoras con aceite de sardina

	T1	T2
Consumo de alimento (g/ave/d)	115.00 ± 7.13	110.85 ± 10.26
Producción de huevo (%)	84.31 ± 7.52 a	77.28 ± 7.64 b
Peso de huevo (g)	67.25 ± 1.78	66.64 ± 4.33
Masa de huevo (g)	56.77 ± 6.07 a	51.60 ± 6.84 b
Conversión alimenticia	2.06 ± 0.22 b	2.28 ± 0.41 a
Color de yema	8.74 ± 1.11 b	9.60 ± 0.49 a

a, b En cada renglón, literales distintas indican diferencia estadística ($P \leq 0.05$)

T1 – dieta base (DB), T2- DB+2.5% de aceite de sardina

Evaluación sensorial

Los resultados no mostraron diferencia en la aceptación por el sabor del huevo y el color de la yema, cuando la dieta fue suplementada con AS ($P>0.05$).

Ácidos grasos en el huevo

Suplementar las dietas con AS causó cambios significativos en la composición en AG del huevo (Cuadro 9). La concentración total de AGS se incrementó 5%, principalmente la de los ácidos mirístico (C14:0) y palmítico (C16:0) ($P<0.05$). Lo mismo se observó con los AGM, siendo en este caso, el palmitoleico (C16:1), oleico (C18:1) y cis-vaccénico (C18:1) los que mostraron los mayores incrementos ($P<0.05$). Por lo contrario, el total de AGPI disminuyó significativamente un 27%; sin embargo, este descenso estuvo dado principalmente en los omega 6, ya que en forma inversa los AG eicosapentaenoico (C20:5), docosapentaenoico (C22:5 n3 DPA) y docosahexaenoico (C22:6 n3 DHA) de la serie n3 aumentaron significativamente ($P<0.05$). El incremento en el total de los AGn3 en la yema fue del orden de 62%; estando más del 80% conformado por la suma de los ácidos grasos EPA+DPA+DHA. La relación n6:n3 en el huevo, se redujo notablemente cuando se suplementó la dieta con AS, pasando de 11:1 a 2:1 ($P<0.05$).

En ninguno de los dos tratamientos se detectaron en el huevo AGS menores a 14 carbonos, así como tampoco el heneicosanoico (C21:0), behénico (C22:0), tricosanoico (C23:0), lignocérico (C24:0), erúcico (C22:1), cis-13,16-docosadienoico (22:2) y nervónico (C24:1).

Otros AG se detectaron en concentraciones menores al 1% del total de ácidos grasos (TAG) como fue el caso de los AG: mirístico (C14:0), pentadecanoico (C15:1), cis10-pentadecenoico (C15:1), palmitelaídico (C16:1), heptadecanoico (C17:0), cis10-heptadecanoico (C17:1), elaídico (C18:1), linolelaelaídico (C18:2), γ -linolénico (C18:3n6 GLA), α -linolénico (C18:3n3 ALA), araquídico (C20:0), eicosenoico (C20:1), cis 11,14 eicosadienoico (C20:2), cis 11,14,17 eicosatrienoico (C20:3), cis 8,11,14 eicatrienoico (C20:3), eicosapentaenoico (C20:5 n3 EPA) y docosapentaenoico (C22:5 n6 DPA) (solo se presentan datos de algunos de ellos en el Cuadro 9).

Por otra parte, conservar el huevo durante varios días a temperatura ambiente, también originó cambios en la composición de AG del mismo (Cuadro 9). En el tratamiento con solo la dieta testigo, el total de AGS mostró una reducción de 1.3% a los 60 d, con respecto al día 30; el mirístico y palmítico no cambiaron, solo el esteárico disminuyó ($P<0.05$). Los cambios en los AGM se hicieron evidentes hasta el día 60, momento en el que los AG palmitoleico y oleico mostraron valores mas altos que en el día 30 ($P<0.05$).

En el caso de los AGPI, se observó que el total de estos AG se redujo 11% a los 60 d con respecto a los días 0 y 30. Pero en forma particular, fue notorio que la concentración de los AG linoleico, γ -linolénico y α -linolénico en el huevo mostró valores mas bajos a los 60 d, que en los días 0 y 30. Por lo contrario, los AG araquidónico, EPA, DPAn6, DPAn3 y DHA mostraron los valores mas altos a los 60 d ($P<0.05$). Los n6 en general disminuyeron también 11% a los 60 días ($P<0.05$), mientras que en el total de n3 no hubo cambios significativos a lo largo de estos 60 días ($P<0.05$).

Ahora bien, cuando la dieta fue suplementada con AS, los cambios observados en el huevo conservado durante 60 d a temperatura ambiente fueron los siguientes: al igual que en el caso anterior el total de AGS en la yema solo se redujo un 1.3% a los 60 d, aunque en este caso fue el palmítico el AG que mostró esa pequeña reducción ($P<0.05$). Contrario a lo ocurrido en el tratamiento T1, el total de AGM se mantuvo constante a lo largo del periodo ($P>0.05$), siendo el palmitoleico, el único que manifestó una reducción de 6%, el día 60 con respecto al día 0. Respecto a los AGPI, los AG linoleico, α -linolénico, araquidónico y docosahexaenoico, no mostraron cambios significativos a lo largo de los 60 días ($P>0.05$).

En el tratamiento experimental, la concentración de los n6 en el huevo se mantuvo constante durante todo el periodo de conservación ($P>0.05$), mientras que la concentración de los n3 mostró los valores mas altos a los 60 d ($P<0.05$). La relación n6:n3 no mostró cambios a lo largo de los 60 d ($P>0.05$).

Malondialdehido (MDA) en yema

La concentración de MDA en yema, fue mas alta en el tratamiento donde la dieta estaba suplementada con AS ($P<0.05$) que en el tratamiento con la dieta base (1.61 vs 1.21 nmol/mL). Este comportamiento se hizo evidente tanto en el día 0, como a los 30 y 60 días

de conservación ($P>0.05$) (Figura 12). Tanto en el grupo testigo (1.21, 1.59, 0.79 nmo/mL) como en el experimental (1.61, 1.93, 1.16 nmoL/mL), la formación de MDA se incrementó a los 30 días de conservación del huevo a temperatura ambiente ($P<0.05$); sin embargo, a los 60 días los valores disminuyeron notablemente ($P<0.05$) en ambos tratamientos.

Cuadro 9. Contenido de lípidos totales y composición en ácidos grasos del huevo conservado a temperatura ambiente durante 60 días, al suplementar la dieta para gallinas con aceite de sardina

Componente químico	T1			T2		
	0	30	60	0	30	60
Lípidos totales (g/100 g) ¹	11.74 a	11.49 a	11.34 a	11.41 a	11.58 a	11.60 a
Acido graso (%TAG) ²						
Mirístico (C14:0)	0.34 d	0.38 c	0.35 dc	0.48 b	0.54 a	0.52 a
Palmítico (C16:0)	24.62 e	24.88 d	24.89 d	26.90 a	26.40 b	26.06 c
Esteárico (C18:0)	8.57 b	8.88 a	8.45 cb	7.95 e	8.31 cd	8.22 d
Total AGS	33.53 d	34.14 c	33.69 d	35.34 a	35.25 a	34.80 b
Palmitoleico (C16:1)	2.33 e	2.34 e	2.55 d	3.61 a	3.31 c	3.40 b
Oleico (C18:1)	40.90 b	40.93 b	42.15 a	42.66 a	42.63 a	42.64 a
Cis-vaccénico (C18:1)	1.57 bc	1.50 c	1.47 c	1.87 a	1.71 ba	1.80 a
Total AGM	44.80 c	44.77 c	46.17 b	48.14 a	47.65 a	47.83 a
Linoleico (C18:2 LA n6)	15.95 a	16.03 a	13.90 b	9.46 d	9.85 c	9.52 dc
γ-linolénico (C18:3 GLA n6)	0.13 b	0.15 a	0.04 e	0.06 c	0.05 dc	0.05 de
α-linolénico (C18:3 ALA n3)	0.65 a	0.67 a	0.52 b	0.37 c	0.38 c	0.37 c
Araquidónico (C20:4 AA n6)	1.82 ba	1.80 b	1.90 a	0.65 c	0.63 c	0.71 c
Eicosapentaenoico (C20:5 EPA n3)	0.00 e	0.04 d	0.02 d	0.41 b	0.39 c	0.53 a
Docosapentaenoico (C22:5 DPA n6)	0.33 a	0.31 b	0.35 a	0.03 c	0.00 d	0.03 c
Docosapentaenoico (C22:5 DPA n3)	0.11 dc	0.11 d	0.12 c	0.35 b	0.38 a	0.39 a
Docosahexaenoico (C22:6 DHA n3)	0.84 b	0.85 b	0.92 b	3.12 a	3.08 a	3.26 ^a
Total AGPI	19.84 a	19.95 a	17.77 b	14.46 d	14.76 dc	14.85 c
Total n6	18.24 a	18.29 a	16.18 b	10.20 c	10.53 c	10.30 c
Total n3	1.60 c	1.66 c	1.59 c	4.26 b	4.23 b	4.55 a
n6:n3	11.41 a	11.03 a	10.20 b	2.42 c	2.50 c	2.27 c

¹ en 100 g de huevo completo (yema+clara), ² TAG=total de ácidos grasos

a, b, c, d,e,f En cada renglón, literales distintas indican diferencia estadística ($P\leq 0.05$)
T1- dieta base (DB), T2- DB+ 2.5% aceite de sardina

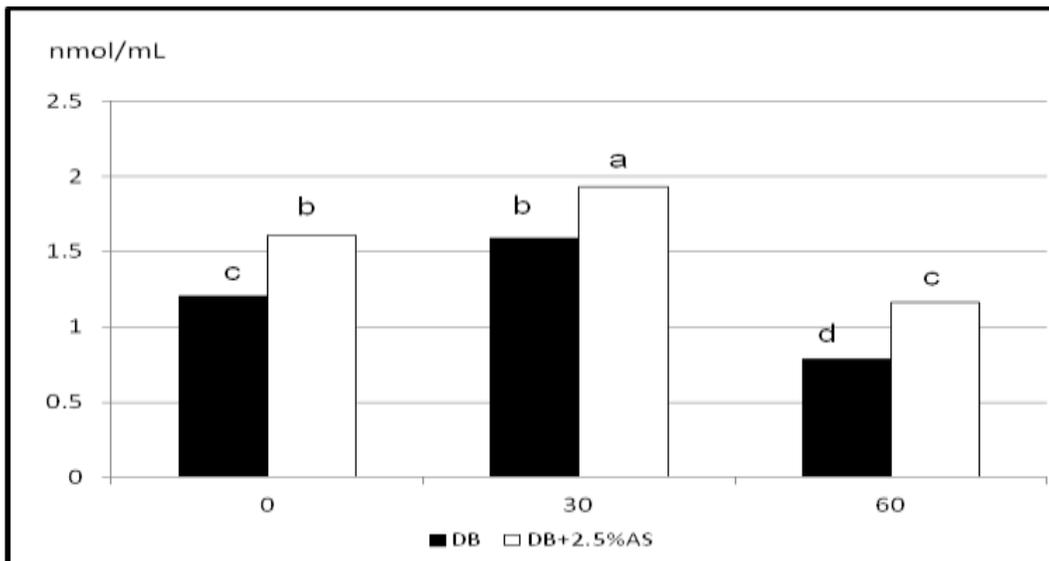


Figura 12. Concentración de malondialdehído (MDA) (nmol/mL) en la yema de huevo conservado a temperatura ambiente durante 60 días, al suplementar la dieta de las gallinas con aceite de sardina T1- dieta base (DB), T2- DB+ 2.5% aceite de sardina

Discusión

Aceites y Dietas

Tal como se observó en los resultados, existe una gran diferencia en la composición de ácidos grasos entre los aceites vegetales y los de origen marino. Los aceites vegetales poseen ácidos grasos de cadena larga de 18 o menos carbonos (ej. aceite de soya, de oliva, canola, linaza); mientras que los de origen marino se caracterizan por tener ácidos grasos de cadena mas larga (C20-C24) (Bailey,1984; Ackman, 2005).

El perfil de AG del aceite de sardina (AS) utilizado en el presente estudio, resultó similar a lo reportado por otros autores (Gámez-Meza et al. 1999; Ackman, 2005; Bandarra et al. 2007; Noriega-Rodríguez et al. 2009). Aunque el ácido esteárico (C18:0) se encontró en altas concentraciones en el AS, este tiene poca o ninguna influencia sobre la capacidad de aumentar el nivel de colesterol sérico, contrario al efecto que el resto de los AGS ocasionan (Conchillo et al. 2006).

El hecho de que el AS tuviera mas EPA (C20:5 n3) que DHA (C22:6 n3) concuerda con lo hallado por otros autores en especies grasosas semejantes a la sardina, tal es el caso de los aceites crudos de sábalo (EPA fluctua entre 11.1% - 16.3% y el DHA de 4.6% - 13.8%), de arenque americano (EPA varia entre 3.9 - 15.2% y DHA 2.0 -7.8%) (Stansby, 1991); de anchoas (EPA 22% y DHA 9%) y de menhaden (EPA 21% y DHA 7%). Los aceites de atún por lo contrario, tienen más DHA (21%) que EPA (8%) (Bimbo, 1999; Cachaldora et al. 2006). En consecuencia, la dieta experimental que incluía aceite de sardina, tenía mas EPA (3.6-3.9%) que DHA (0.43-0.51%).

Variables productivas

Los resultados obtenidos concuerdan con lo informado por Cachaldora et al. (2006,2007), quienes no encontraron efecto alguno sobre el consumo de alimento y peso del huevo al suplementar la dieta de las aves con diferentes tipos de aceites de pescado y diferentes niveles de inclusión del mismo (1.5%, 3%, 4.5% y 6.0%). Sin embargo, al igual que en el presente trabajo, observaron un decremento lineal y cuadrático en la producción de huevo. En el color de la yema observaron una interacción entre el tipo y concentración del aceite de menhaden, incrementándose ésta cuando las gallinas recibieron aceite de menhaden MFO1 (que tenía 8.3% de EPA y 8.2% de DHA), en comparación con MFO2 y MFO3 cuyas proporciones de estos dos AG eran diferentes (EPA 21% y DHA 7% en MFO2; EPA 8% y DHA 21% en MFO3).

Pappas et al. (2006) observaron una significativa reducción en el peso del huevo al suministrar a las aves, dietas suplementadas con 5.5% de aceite de pescado. Cherian (2008) informa un decremento en el peso del huevo y en el color de la yema al adicionar 3.5% de aceite de pescado a la dieta.

Otros autores observaron una reducción tanto en la producción como en el peso del huevo, al suplementar la dieta para gallinas ponedoras con aceite de pescado (Hargis y Van Elswyk, 1993; Cloughley et al.1997; Maurice, 1994; González-Esquerria y Leeson, 2001; Surai y Spark, 2001), con 4.8% de una microalga marina con alto contenido de DHA (Herber-McNeill y Van Elswyk, 1996), y cuando han utilizado al cebo (5 a 7%) como

única fuente de grasa en dietas para gallinas ponedoras (Watkins y Elkin 1992, Grobas et al. 2001, González-Muñoz et al. 2009)

Cornejo et al. (2008) y Cherian et al. (2007) no encontraron cambios en las variables productivas al incorporar 6% de AP en el primer caso; así como 0.25% y 0.5% de AP en el segundo caso.

Es posible que la reducción observada en la producción de huevo sea consecuencia de la disminución en el consumo, posiblemente el sabor de las dietas suplementadas con aceite de sardina no resultó agradable a las aves. También pudiera deberse al hecho de que el aceite de sardina tiene una densidad energética menor que el aceite de soya, por lo tanto la energía aportada por la dieta dos fue menor. Otras hipótesis han sido señaladas por diversos autores (Van Elswyk 1997a; González-Esquerria y Lesson, 2001; Cachaldora et al. 2006). Ellos señalan que la disminución observada en la producción y/o peso del huevo pudiera deberse al efecto reductor de los AGn3 sobre la cantidad de lípidos y estradiol en suero (lo que limitaría la disponibilidad de lípidos para la formación de yema). Sin embargo, otro factor pudiera ser el hecho de que al suministrar en la dieta ingredientes con alto contenido de AGn3, se reduce la concentración del ácido linoleico (C18:2 n6 LA) y por ende la producción de la PGE₂ (Simopoulos, 2006, 2008). Algunos estudios (Hertelendy y Biellier, 1978; Hudelson y Hudelson, 1996), han demostrado que la PGE₁ y la PGE₂ son de gran importancia en el proceso reproductivo, estimulan las contracciones, relajan el esfínter uterovaginal y la vagina facilitando la ovoposición en la gallina. Por lo tanto, al existir en el ave un decremento en la producción de estas hormonas como consecuencia de la reducción sérica del LA, precursor del AA y este de eicosanoides como la PGE₁ y PGE₂, la producción y peso del huevo se ven afectadas (Lee y Hwang, 2008; Simopolous, 2008).

Los eicosanoides provenientes del AA son biológicamente activos aun en pequeñas cantidades, mientras que los eicosanoides provenientes del EPA poseen una baja actividad biológica (Simopolous, 2006).

Coloración de la yema

El aumento en la coloración de la yema cuando la dieta fue suplementada con AS, seguramente se debió a la presencia de pigmentos en el aceite de pescado, los cuales varían

de acuerdo a la alimentación de los peces (Bailey, 1984; Roldan-Libenson et al. 1999). En el caso de la sardina, su principal alimento es el fitoplancton (Cellamare y Gómez, 2007), el cual posee pigmentos tales como clorofila, antocianinas, luteína, diatoxantina, diadinoxantina, prasinoxantina, fucoxantina, peridinina, zeaxantina y violaxantina (Millan et al. 2004). Por lo tanto, en el aceite de sardina seguramente estos pigmentos estaban presentes y las xantofilas fueron depositadas en la yema de huevo.

Esto es de gran interés no solo para el avicultor sino también para el consumidor, ya que como señala Clydesdale (1998) la apariencia visual, especialmente el color, es la característica más importante de los alimentos que determina ser seleccionado para su consumo. En gran parte de México y de otros países, los consumidores demandan la buena pigmentación de la yema. En el caso de México, Brasil y Chile se prefieren yemas con un valor promedio de 11 (del abanico Roche); en EEUU, Irlanda y Perú de 9, en Argentina y Venezuela de 8, mientras que en España se prefiere el 13 (Becerril, 1988). Sin embargo, los beneficios de incrementar la coloración de la yema a través de carotenoides naturales van más allá del atractivo visual. Estudios realizados por Chung et al. (2004) y Goodrow et al. (2006) revelan que los pigmentos presentes en la yema de huevo, principalmente luteína y zeaxantina, tienen una alta biodisponibilidad en el humano y son importantes en la prevención de cataratas y degeneración macular en la retina.

Por otra parte, el hecho de que las yemas hayan estado más pigmentadas en el T2 que en el T1 es un aspecto positivo que indica que el aceite de sardina utilizado estaba en buenas condiciones, ya que cuando existe un proceso de oxidación, las propiedades cromógenas pueden reducirse, ya que los carotenoides están formados por cadenas hidrocarbonadas altamente insaturadas (Bailey, 1984; Clydesdale, 1998).

Evaluación sensorial

El hecho de que no se haya detectado diferencia entre los dos tratamientos, en el grado de aceptación por el color de la yema, aun cuando las yemas del T2 (DT+AS) estaban más pigmentadas, pudiera deberse a dos razones. La primera es que la prueba utilizada era subjetiva, por lo que los resultados están dados en base a la apreciación visual de cada panelista lo que origina una amplia variación. Por lo mismo, sería recomendable

aumentar el número de participantes. En segundo lugar, pudiera ser indicativo de que el aceite utilizado en el presente estudio era de buena calidad, procesado a partir de pescado fresco y estaba protegido con antioxidante.

Es importante señalar que aun cuando el aceite de pescado sea de buena calidad, el sabor a pescado que pudiera adquirir el huevo, pudiera ser resultado de la rancidez en las dietas suplementadas con el aceite de pescado. Por lo tanto, es de gran importancia asegurarse también de que las dietas que se van a emplear, estén protegidas con antioxidantes, ya que una vez oxidado, ya sea el aceite como las dietas, la adición de antioxidantes no revertirá la situación (Surai y Spark, 2001).

El que no se haya afectado el sabor del huevo concuerda con lo observado por García-Rebollar et al. (2008) cuando suplementó dietas con 1.5 y 1.7% de aceite de pescado. Pero difiere de los resultados obtenidos por Adams et al. (1989) y Van Elswyk et al. (1992), donde los panelistas detectaron un sabor desagradable cuando la dieta de las aves fue suplementada con 6% y 3% de aceite de menhaden, respectivamente. Van Elswyk et al. (1995) hallaron un mayor contenido de compuestos volátiles de bajo, más que de alto, peso molecular en huevos de gallinas cuyas dietas fueron suplementadas con aceite de menhaden, atribuyendo a estos la impartición de un sabor desagradable al producto.

González-Esquerri y Leeson (2000) hallaron que aun deodorizando el aceite de menhaden, el huevo adquiría el característico sabor a pescado. Bailey (1984) asocia el olor y sabor a pescado con la presencia de compuestos nitrogenados y glicéridos altamente insaturados y como consecuencia de la combinación química de estos compuestos, durante la oxidación de los glicéridos. También menciona que la presencia de aldehídos de peso molecular medio, en particular de los aldehídos caprílico y caprínico, formados por la oxidación y ruptura de una cadena de AG, pueden ser la causa de dichos efectos en el huevo.

Algunos autores consideran que el olor y sabor a pescado que el huevo adquiere cuando la dieta de las aves es suplementada con aceite de pescado, se debe a la reducción del óxido de trimetilamina y/o a la autooxidación de los AGn3, ya que estos son muy susceptibles a oxidarse (Belitz y Grosch, 1997; Surai y Spark, 2001; Eskin and Przybylski,

2001). Este efecto no solo ha sido observado con el AS sino también cuando la dieta ha sido suplementada con linaza (Surai y Spark, 2001).

Asimismo, es pertinente recordar que la aceptación de sabor a pescado varía de un país a otro. Por ejemplo, en Chile la gente está acostumbrada a este sabor y lo acepta como normal, mientras que para los europeos, esto es inaceptable. (Surai y Spark, 2001).

Efecto de la suplementación de la dieta con AS sobre el contenido de lípidos totales y la composición en AG del huevo

El que la cantidad de lípidos totales en el huevo no haya sido afectada por el tipo de dieta concuerda con lo informado por Cherian *et al.* (1996), quienes al incorporar 3.5% de aceite de menhaden, aceite de palma, aceite de lino o aceite de girasol a dietas para gallinas, no observaron cambio alguno en el contenido de lípidos en la yema. De igual manera Van Elswyk *et al.* (1992) y Castillo-Badillo *et al.* (2005) no detectaron diferencias en el contenido de lípidos totales cuando suplementaron la dieta con 3% de aceite menhaden y con 1 y 2% de ceite de atún, respectivamente. Esto indica que independientemente de la fuente (vegetal o marina) que se emplee para incrementar los AGn3 en el huevo, la cantidad total de lípidos no se verá modificada, pero sí la composición en ácidos grasos.

Aunque la composición en ácidos grasos del huevo, en general, fue un reflejo de la composición de las dietas; hubieron algunas excepciones. La **primera** es que aun cuando la dieta con AS, tenía 26% menos ácido oleico que la dieta testigo, en el huevo la concentración de este AG no solo se incrementó, sino hasta superó en 4.5% mas su concentración, con respecto al huevo del T1.

El **segundo** cambio notable fue que la dieta con AS tenía 137% mas araquidónico que la dieta testigo, pero en el huevo la concentración de este ácido se redujo 64%, en comparación con T1. Melluzzi *et al.* (2000), observaron éste mismo comportamiento (25.54 vs. 67.72 mg/egg de AA) como consecuencia de la suplementación con aceite de pescado; pero también observaron un incremento de todos los ácidos grasos n-3 en la yema; particularmente EPA (19.53 vs. 0.74 mg/egg) y DHA (143.70 vs. 43.66 mg/huevo).

Un **tercer** aspecto fue que en la dieta con AS existía una mayor concentración de EPA que DHA, sin embargo en el huevo sucedió lo contrario, había más DHA que EPA.

Esto concuerda con lo observado por Huang et al. (1990) quienes informan que al suplementar la dieta de las gallinas con 3% de aceite de menhaden (11% EPA y 9% DHA), hay una mayor deposición de DHA en la yema (29 vs 192 mg de EPA y DHA respectivamente). La explicación a ello pudiera estar relacionada con el metabolismo de los AGn3 en las aves, donde al parecer existe una mayor preferencia de las enzimas para depositar DHA en los tejidos, así como una mayor eficiencia de retención del DHA en los mismos, tal como ocurre en el humano (Sprecher et al. 1995; González-Esquerria y Lesson, 2001; Alvarez et al. 2004).

Esto no quiere decir que el EPA sea menos importante, ambos cumplen funciones diferentes. A partir del EPA se forma una amplia variedad de compuestos biológicamente activos conocidos como eicosanoides (prostaglandinas y leucotrienos), potentes reguladores de la actividad biológica; este AG es capaz de ser elongado a ácido docosapentaenoico (C22:5 n3 DPA) y este a su vez a DHA (C22:6 n3). El DHA, por su parte, puede ser retroconvertido a EPA, siendo su aspecto más significativo ser el principal componente estructural en las membranas celulares del sistema nervioso y de la retina. En éstas puede constituir aproximadamente el 60% de los AGPI presentes y es tal su importancia que algunas investigaciones señalan que una deficiencia de este ácido graso puede dar origen a algunas anormalidades funcionales (Rice, 1999).

El que la relación n6:n3 en el huevo se redujera notablemente al suplementar la dieta con AS, pasando de 11:1 a una de 2:1, resulta ser de gran importancia, ya que habitualmente el huevo comercial tiene una alta proporción de n6, y un bajo contenido de n3 (9:1)(Surai y Spark, 2001; Seuss-Baum, 2007), similar a una típica dieta occidental (10:1), lo cual se asocia con un incremento en el riesgo de padecer enfermedades cardiovasculares, ciertos tipos de cánceres, etc. (Gebauer et al. 2008). La relación n6:n3 recomendada en una dieta habitual va de 1:1 a 4:1 (Yannakopoulos, 2007); ya que como se sabe, los n6 y los n3, son dos clases de AGPI metabólica y funcionalmente distintos con efectos fisiológicos opuestos, por lo que mantener un balance adecuado n6:n3 es de gran importancia, ya que ambos compiten por las mismas enzimas. Al parecer, los n3 son preferidos por las enzimas delta-desaturasas (Surai y Spark, 2001).

Por otra parte, la razón por la cual la cuantificación de los ácidos grasos se realizó hasta la cuarta semana fue que la incorporación de AGn3 procedentes de la dieta, en la yema es un proceso gradual, a los 9 días de experimentación se empiezan a notar los cambios en la composición de los AG en la yema y es a partir de los 21 días que la concentración de los AG se estabiliza (Cherian, 2007; Seuss-Baum, 2007). Yu and Sim (1987) suplementaron la dieta de las gallinas con diferentes niveles de inclusión de aceite de salmón, alcanzando la máxima incorporación de los n3 a los 8 días. Lin et al. (1995) suplementaron la dieta con 1.5% de aceite de menhaden y diariamente, por un periodo de 14 días, registraron la concentración de n3 en la yema, los resultados mostraron que a los 14 días la composición de AG en el huevo había sido modificada. Van Elswyk (1997a) alimentó a las aves con diferentes niveles de aceite de menhaden observando una deposición gradual de n3 de la semana 0 a la 3, estabilizándose el contenido y la composición entre las semanas 3 y 4. Los tratamientos con los mas altos niveles de aceite de menhaden (AMH) alcanzaron mas pronto el plateau, que los tratamientos con bajos niveles. Después de remover las dietas experimentales, el contenido de n3 en las yemas disminuyó 20% durante las dos primeras semanas, en la tercera se mantuvo constante y en la semana 4, los tratamientos con 0.5, 1% y 1.5%, alcanzaron los mismos valores que el grupo testigo. Estos resultados ilustran el turnover de los lípidos en la yema.

Efecto del tiempo sobre la composición en AG del huevo almacenado a temperatura ambiente

La formación de MDA, tanto en el tratamiento T1 como en el que se suplementó con AS, indican que desde el momento en que el huevo se expone a factores externos como la luz y la temperatura, se inicia el proceso oxidativo. Pero el hecho de haya una mayor cantidad de MDA en el T2, también demuestra que suplementar la dieta con AS favorece aun mas la formación de radicales libres (RL).

Por otra parte, el hecho de que el perfil de ácidos grasos en general se haya mantenido constante durante los 60 días en que se mantuvo el huevo a temperatura ambiente (20 C) concuerda con lo señalado por otros autores quienes señalan que el perfil

de AG de huevos enriquecidos con AGn3 no se altera durante el cocimiento (Van Elswyk et al.1992) o durante siete semanas de almacenamiento a 25 C (Oku et al. 1996). Aymond y Van Elswyk (1995), tampoco observaron cambios en los valores de MDA en huevos enriquecidos con n3, cuando aceite de linaza fue incluido en la dieta de las aves, en comparación con el grupo testigo.

Otros en cambio, informan un incremento en la susceptibilidad a la oxidación durante al almacenamiento y cocimiento del huevo (Cherian et al. 1996).

Marshall et al. (1994) notaron que en el huevo fresco de gallinas cuya dieta había sido suplementada con 1.5% de aceite de menhaden, presentaba mayor concentración de sustancias reactivas al ácido tiobarbiturico (TBARS) que en el huevo de gallinas sin suplementar. Aun cuando a la dieta con aceite de menhaden se le habían adicionado 12.5 mg de alfa-tocoferol/ave/d (la recomendación del NRC para una dieta convencional es de 0.5 mg/ave/d).

Es posible que los antioxidantes propios en el ave (carotenoides, vitamina E, fosvitina, selenio, etc), presentes en el huevo (Guérin-Dubiard et al. 2007), contribuyan a proteger a estos AG por la importancia fisiológica que tienen para el ave; y que los compuestos oxidados detectados desde el primer día de almacenamiento en ambos tratamientos mediante la prueba de TBARS hayan sido otros, diferentes a los AG. Marshall et al. (1994) sugieren que los TBARS en yema son el resultado de la transferencia directa de lípidos oxidados presentes en la dieta o producidos en el hígado y posteriormente transferidos a la yema junto con otros materiales lipofílicos.

La síntesis de sustancias reactivas al ácido tiobarbiturico (TBARS) en el hígado de gallinas ponedoras ha sido confirmado por Caston et al. (1994) cuando comparó una dieta convencional como testigo contra otras que tenían 10 ó 20% de linaza molida. Encontraron un incremento de TBARS en el hígado, proporcional al nivel de inclusión de linaza en la dieta.

Aymond y Van Elswyk (1995) sugieren que las condiciones en las que se almacenan las dietas, tal como el uso de contenedores hermeticos mantenidos en refrigeración, pueden reducir una potencial deposición de TBARS en la yema.

El EPA y DHA son altamente susceptibles a la oxidación debido al alto número de dobles enlaces reactivos. La fracción polar es altamente insaturada y al parecer la fosfatidilcolina es importante en la degradación de los lípidos del pescado (Takahashi et al. 1985). Los aceites se prestan a una fácil oxidación, pues se vuelven rancios durante la elaboración y el almacenamiento, esta oxidación se acelera por el calor, la luz y la presencia de catalizadores y pueden ser contrarrestada administrando antioxidantes, o almacenándolos en lugares oscuros (Cifuentes et al. 1997).

Por otra parte, el hecho de que a los 60 días la concentración de MDA haya sido menor que al inicio y que a los 30 de almacenamiento no precisamente indica que haya habido menor oxidación, lo mas probable es que se hayan formado otros compuestos productos de la oxidación, diferentes al MDA y que por lo tanto no pudieron ser medidos a través de la prueba de TBARS. Se sabe que durante la oxidación lipídica se generan los precursores del MDA (hidroxiperoxi epidioxidos, 1,3 dihidroxiperoxidos, 1,4 dihidroperoxido y los monohidroxiperoxidos) así como diversos compuestos que pueden reaccionar con el TBA por lo que los datos obtenidos con este método no son un reflejo exacto del grado de oxidación del sistema. Por lo tanto sería recomendable utilizar otras pruebas, además de la de TBARS, para conocer con mayor precisión el grado de oxidación en el huevo y poder identificar los compuestos que se oxidaron (Frankel y Neff, 1983; Guillen-Sanz y Guzmán-Chozas, 1998).

Utilizar el aceite de sardina con el fin de enriquecer al huevo con AGn3 es por el momento una alternativa no costosa, que debiera ser aprovechada en México por los avicultores (Gamez-Meza et al. 1999). Más aun cuando estudios realizados por Noriega et al (2002) han demostrado que el AS refinado, blanqueado, deodorizado y no deodorizado conserva el alto contenido de estos ácidos grasos.

Conclusión

Se concluye que utilizar el aceite de sardina en la dieta para gallinas es una alternativa para enriquecer el huevo con ácidos grasos omega 3 y reducir la relación n6:n3 en el mismo, lográndose mantener esta situación aun hasta por 60 días de almacenamiento a temperatura ambiente (20°C). Aun así, se sugiere adicionar antioxidante tanto al aceite

como a las dietas para reducir el riesgo de oxidación tanto lipídica como de otros compuestos en el huevo.

Aprovechar al aceite de sardina como fuente de EPA y DHA en la industria de alimentos balanceados para aves, puede ser una importante fuente de ingresos para los estados productores de sardina, ya que en México no ha sido aprovechado como tal. Monitorear la calidad de los aceites utilizados en la dieta, así como mantener las dietas en condiciones hermeticas y en refrigeración puede ser de gran utilidad para esclarecer si la oxidación en el huevo enriquecido con AGn3 es consecuencia de una mala calidad del aceite de pescado utilizado, de una deficiente conservación de las dietas suplementadas con AP o de una deficiente conservación del huevo enriquecido con AGn3. Asimismo es importante utilizar otras pruebas, además de la de TBARS, para medir el grado de oxidación cuando el huevo ha sido enriquecido con AGn3.

Referencias

- Ackman RG. 2005. Fish Oil. In: F.Sahidi (Ed) Bailey's industrial oil and fat products. 6th ed. Vol 3 pp. 279-317. Hoboken NJ: John Wiley & Sons Inc.
- Adams RL, Pratt DE, Lin JH, and Stadelman WJ. 1989. Introduction of omega-3 polyunsaturated fatty acids into eggs. *Poult. Sci.* 68 (Suppl 1): 166.
- Ahn DU, Sunwoo HH, Wolfe EH, Sim JS. 1995. Effects of dietary alfa-linolenic acid and strain of hen on the fatty acid composition, storage stability, and flavor characteristics of chicken eggs. *Poult Sci.* 74: 1540-1547.
- Alvarez C, Cachaldora P, Méndez J, García-Rebollar P and Blas JC de. 2004. Effects of dietary conjugated linoleic acid and fish oil supplementation on performance and egg quality in laying hens. *Br Poult Sci.* 45: 524-529.
- Anzaldúa-Morales A. 1994. La Evaluación Sensorial de los Alimentos en la Teoría y en la Práctica. Editorial Acribia, Zaragoza, España.
- AOAC 2000. Official Methods of Analysis. 17th ed. Association Official of Analytical Chemists. AOAC International. Washington D.C. USA.
- Aymond WM, Van Elswyk ME. 1995. Yolk thiobarbituric acid reactive substances and n-3 fatty acids in response to whole and ground flaxseed. *Poult Sci.* 74:1388-1394.
- Bailey AE. 1984. Aceites y Grasas Industriales. Segunda edición. Editorial Reverte. 675 pp.
- Bandarra N, Batista I, Nunes M, Empis J, and Christie W. 1997. Seasonal changes in lipid composition of Sardine (*Sardina pilchardus*). *J Food Sci* 62: 40-42.
- Belitz, HD y Grosch W. 1997. Química de los Alimentos 2a ed. Ed. Acribia S.A. de C.V. Zaragoza España. pp.678-679.
- Bimbo A. Pautas para la clasificación del aceite de pescado comestible. *Aceites y Grasas* 410-421.
- Botsoglou NA, Fletouris DJ, Papageorgiou GE, Vassilopoulos VN, Mantis AJ, Trakatellis AG. 1994. Rapid, sensitive, and specific thiobarbituric acid method for measuring lipid peroxidation in animal tissue, food, and feedstuff samples. *J Agric Food Chem* 42: 1931-1937.
- Burgess JR, Stevens L, Zhang W, Peck L. 2000. Long-chain polyunsaturated fatty acids in children with attention-deficit hyperactivity disorder. *Am J Clin Nutr* 71 (suppl):327s-330s.

- Cachaldora P, García-Rebollar P, Álvarez C, De Blas J, Méndez J. 2006. Effect of type and level of fish oil supplementation on yolk fat composition and n-3 fatty acids retention efficiency in laying hens. *Br Poult Sci* 47: 43-49.
- Cachaldora P, García-Rebollar P, Alvarez C, De Blas JC, Méndez J. 2007. Effect of type and level of basal fat and level of fish oil supplementation on yolk fat composition and n-3 fatty acids deposition efficiency in laying hens. *Anim Feed Sci Tech* 141: 104-114.
- Carranco JME, Calvo CC, Arellano ML, Pérez-Gil RF, Ávila GE, Fuente MB. 2003. Inclusión de la harina de cabezas de camarón *Penaeus* sp. en raciones para gallinas ponedoras. Efecto sobre la concentración de pigmento rojo en yema y calidad de huevo. *Interciencia* 28: 328-333.
- Carrillo DS, Carranco JME, Castillo DRM, Castro GMI, Avila GE, Pérez-Gil RF. 2005. Cholesterol, n-3 and n-6 fatty acids content in eggs from laying hens fed with Red Crab Meal (*Pleuroncodes planipes*). *Poultry Sci.* 84: 167-172.
- Castillo-Badillo C, Vázquez-Valladolid JL, González-Alcorta M, Morales-Barrera E, Castillo-Domínguez RM, Carrillo-Domínguez S. 2005. El aceite de atún como fuente de ácidos grasos w-3 en el huevo de gallina. *Grasas y Aceites* 56, 153-159.
- Cellamare M, Gómez GA. 2007. Alimentación de la sardina *Sardinella aurita* (Clupeidae) en el sureste de la Isla Margarita, Venezuela. *Bol. Inst.Oceanogr. Venezuela* 46:23-36.
- Cherian G, Wolfe FW, Sim J. 1996. Dietary oils with added tocopherols: effects on egg or tissue tocopherols, fatty acids, and oxidative stability. *Poult Sci.* 75:423-431.
- Cherian G. 2007. Omega-3 Fatty Acids. In: *Wild-Type Food in Health Promotion and Disease Prevention*. F.De Meester and R.R. Watson (Editors), pp. 169-176. Humana Press Inc. Totowa, NJ, USA.
- Cherian G, D González, K Ryu, M Goeger. 2007. Long-term feeding of conjugated linoleic acid and fish oil to laying hens; effects on hepatic histopathology, egg quality, and lipid components. *J Appl Poult Res* 16: 420-428.
- Cherian G. 2008. Egg quality and yolk polyunsaturated fatty acid status in relation to broiler breeder hen age and dietary n-3 oils. *Poult Sci* 87, 1131-1137.
- Chow KC. 2008. *Fatty Acids in Foods and their Health Implications*. 3th ed. CRC Press, Boca Raton, Fla, USA. pp.1257.
- Chung HY, Rasmussen HM, Johnson EJ. 2004. Lutein bioavailability is higher from Lutein-enriched eggs than from supplements and spinach in men. *J Nutr.* 134:1887-1893.
- Cifuentes L JL, Torres GP, Frías MM. 1997. El oceano y sus recursos II. Las ciencias del mar: oceanografía geológica y oceanografía química. Fondo de Cultura Económica, México D.F.
- Clydesdale EM. 1998. Color: origin, stability, measurement, and quality. In: *Food Storage Stability*. Irwin A. Taub and R. Paul Singh (eds). pp. 175-190. CRC Press, Boca Raton, Fla, USA.
- Cloughley J, Noble R, Speake B, Sparks N. 1997. Manipulation of docosahexaenoic (C22:6 n3) acid in the chicken's egg. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids* 57:222.
- CONAPESCA. 2010. Distribuirán más de 100 mil toneladas de productos pesqueros y acuícolas en cuaresma y Semana Santa. www.conapesca.sagarpa.gob.mx/wb/cona/15_de_febrero_de_2010_mazatlan_sin.
- Conchillo A, Valencia I, Puente A, Ansorena D, Astiasarán I. 2006. Componentes funcionales en aceites de pescado y de alga. *Nutr.Hosp.* 21 (3): 369-373.
- Cornejo S, Hidalgo H, Araya J, Pokniak J. 2008. Suplementación de dietas de gallinas de postura comercial con aceites de pescado de diferentes grados de refinación. Efectos productivos en las aves y en la calidad organoléptica de los huevos. *Arch Med Vet* 40: 45-50.
- Eskin NAM, Robinson DS. 2001. *Food Shelf Life Stability*. Chemical, Biochemical, and Microbiological changes. CRC Press, Boca Raton, Florida, USA, 370 pp.
- Eskin NAM, Przybylski R. 2001. Antioxidant and shelf life of foods. In: *Food Shelf Life Stability*, Chemical, Biochemical, and Microbiological Changes. NAM Eskin and DS Robinson (editors), pp.175-209.
- Frankel EN and Neff WE. (1983) Formation of malonaldehyde from lipid oxidation products. *Biochem. Biophys. Acta.* 754:264-270.
- Gamez-Meza N, Higuera-Ciapara I, Calderón de la Barca AM, Vazquez-Moreno L, Noriega-Rodríguez J, Angulo Guerrero O. 1999. Seasonal variation in the fatty acid composition and quality of sardine oil from *Sardinops sagax caerulea* of the Gulf of California. *Lipids* 34:639-642.

- García C. y Albala C. 1998. Composición lipídica de huevos de gallinas alimentadas con productos grasos y proteicos marinos. *Arch.Lat.Nutr.* 48:71-76.
- García-Rebollar P, Cachaldora P, Alvarez C, De Blas C, Méndez J. 2008. Effect of the combined supplementation of diets with increasing levels of fish and linseed oils on yolk fat composition and sensorial quality of eggs in laying hens. *Anim. Feed Sci. Tech.* 140:337-348.
- Gebauer SK, TL Psota, WS Harris, PM Kris-Etherton. 2006. N-3 Fatty acid dietary recommendations and food sources to achieve essentiality and cardiovascular benefits. *Am J Clin Nutr* 83 (suppl):1526S-35S.
- Goodrow EF, Wilson TA, Houde SC, Vishwanathan R, Scollin PA, Handelman G, Nicolosi RJ. 2006. Consumption of one egg per day increases serum lutein and zeaxanthin concentrations in older adults without altering serum lipid and lipoprotein cholesterol concentrations. *J Nutr.* 136:2519-2524.
- González-Esquerria R, Leeson S 2000. Effect of feeding hens regular or deodorized menhaden oil on production parameters, yolk fatty acid profile, and sensory evaluation of eggs. *Poult. Sci.* 79: 1597-1602.
- González-Esquerria R, Leeson S 2001. Alternatives for enrichment of eggs and chicken meat with omega-3 fatty acids. *Can J Anim Sci* 81: 295-305.
- González-Muñoz M, Bastida S, Jiménez O, Lorenzo C, Vergara G, Sánchez-Muñoz F. 2009. The effect of dietary fat on the fatty acid composition and cholesterol content of the eggs from Hy-line and Warren hens. *Grasas y Aceites* 60: 350-359.
- Goodfellow J. 2000. Dietary Supplementation in Subjects with Hypercholesterolemia. *J Am Collect Cardiology* 35:265-270.
- Grobas S, Mendez J, Lázaro R, De Blas C, Mateos GG. 2001. Influence of source and percentage of fat added to diet on performance and fatty acid composition of egg yolks of two strains of laying hens. *Poult. Sci.* 80:1171-1179.
- Guérin-Dubiard C, Castellani O, Anton M. 2007. Egg compounds with antioxidant and mineral binding properties. In: Huopalahati R, López-Fandiño R, Anton M, Schade R (eds.). *Bioactive Egg Compound*, Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, pp.223-228.
- Guillén-Sans R, Guzmán-Chozas M. 1998. The thiobarbituric acid (TBA) reaction in foods: A Review. *Crit Rev Food Sci Nutr* 38(4):315-350.
- Hargis PS, Van Elswyk ME, Hargis BM. 1991. Dietary modification of yolk lipid with menhaden oil. *Poult. Sci.* 70:874-883.
- Hargis PS, Van Elswyk ME. 1993. Manipulating the Fatty Acid Composition of Poultry Meat and Eggs for the Health Conscious consumer. *World's Poultry Sci. J.* 49:251-264.
- Helland IB, Smith L, Saarem K, Saugstad OD, Drevon CA. 2003. Maternal supplementation with very-long-chain n3 fatty acids during pregnancy and lactation augments children's IQ at 4 years of age. *Pediatrics* 111:39-44.
- Hertelendy F, Biellier HV. 1978. Prostaglandin levels in avian blood and reproductive organs. *Biol Reprod.* 18: 204-211.
- Holub B. 2002. Clinical nutrition: 4. Omega-3 fatty acids in cardiovascular care. *JAMC* 166, 608-615.
- Huang Z, Leibovitz H, Lee C, Miller R. 1990. Effect of dietary fish oil on w-3 fatty acid levels and general performance of commercial broilers fed practical levels of redfish meal. *Poult. Sci.* 68: 153-162.
- Hudelson KS, Hudelson P. 1996. A brief review of the female avian reproductive cycle with special emphasis on the role of prostaglandins and clinical applications. *J. Avian Med Surgery* 10:67-74.
- Kralik G, Z Gajcevic, Z Skrtic. 2008. The effect of different oil supplementations on laying performance and fatty acid composition of egg yolk. *Ital J Anim Sci* 7, 173-183.
- Kris-Etherton PM, Harris WS, Appel LJ. 2002. Fish consumption, fish oil, omega-3 fatty acids, and cardiovascular disease. *Circulation* 106:2747-2757.
- Lee JY, Hwang DH. 2008. Dietary fatty acids and eicosanoids. In: *Fatty Acids in Foods and their Health Implications*. Ching Kuang Chow (editor). pp.713-726. Third edition. CRC Press, Boca Raton, Fla, USA.
- Lin JH, Pratt DE, Adams RL and WJ Stadelman. 1995. Influence of dietary menhaden fish oil on fatty acid composition of the egg. *J Food Qual* 18:149-165.
- Marshall AC, Sams AR, Van Elswyk ME. 1994. Oxidation stability and sensory quality of stored eggs from hens fed 1.5% menhaden oil. *J. Food Sci.* 59: 561-563.

- Maurice DV. 1994. Dietary fish oils. Feeding to produce designer eggs. *Feed Management* 45: 29-32.
- Meilgaard M, Civille GV, Carr BT. 1999. *Sensory Evaluation Techniques*. CRC Press. Boca Ratón, Florida, USA. 387 pp.
- Meluzzi A, Sirri F, Manfreda G, Tallarico N, Franchini A. 2000. Effects of dietary vitamin E on the quality of table eggs enriched with n3 long chain fatty acids. *Poult Sci*. 79:539-545.
- Millán NR, Millán NE, Álvarez BS, Trees CC, Santamaría del Angel E. 1994. Variabilidad de la comunidad del fitoplancton Bahía de San Quintin estimada mediante el análisis de pigmentos. *Cienc Mar* 30:145-153,
- Noriega-Rodríguez JA, Ortega-García J, Angulo-Guerrero O, García HS, Medina-Júarez LA, Gamez-Meza N. 2009. Oil production from Sardine (*Sardinops sagax caerulea*). Obtención de aceite de sardina (*Sardinops sagax caerulea*). *CyTA-Journal of Food* 7 (3): 173-179.
- NRC. 1994. *Nutrient Requirement of Poultry*. National Research Council, 9th rev ed. Academy Press, Washington DC. USA.
- Oku T, Kato H, Kunishige-Taguchi T, Hattori M, Wada K, Hayashi M. 1996. Stability of fat soluble components such as n-3 polyunsaturated fatty acids and physiochemical properties in EPA and DHA enriched egg. *Jap J Nutr* 54:109-119.
- Rice R. 1999. Fish Nutritional value. In: *Encyclopedia of Human Nutrition*. MJ Sadler, JJ Strain, B Caballero (eds). Volume II. Pp. 793-803 pp. Academic Press.
- Salih AM, Smith DM, Price JF, Dawson LE. 1987. Modified extraction 2 thiobarbituric acid method for measuring lipid oxidation in poultry. *Poult Sci* 66:1483-1488.
- SAS. 2008. *Statistical Analysis System/STAT. User's Guide*. SAS Institute Inc. Cary, NC. USA.
- Seuss-Baum I. 2007. Nutritional evaluation of egg compounds. In: *Bioactive Egg Compounds*. Rainer Huopalahti, Rosina López-Fandiño, Marc Anton and Rüdiger Schade (editors), pp.117-140. Springer-Verlag Berlin Heidelberg.
- Simopoulos AP. 2006. Evolutionary aspects of diet, the omega-6/omega-3 ratio and genetic variation: nutritional implications for chronic diseases. *Biomed Pharmacother* 60:502-507.
- Simopoulos AP. 2008. The importance of the omega-6/omega-3 fatty acid ratio in cardiovascular disease and other chronic diseases. *Exp Biol Med* 233:674-688.
- Sprecher H, Luthria DL, Mohamed B. And Baykousheva SP. 1995. Reevaluation of the pathways for the biosynthesis of polyunsaturated fatty acids. *J Lipid Res* 36:2471-2477.
- Stak KD. 2000. Effects of fish-oil concentrate in postmenopausal women receiving and not receiving hormone replacement therapy in placebo-controlled, double-blind trial. *Am J Clin Nutr* 72: 389-394.
- Surai PF and Sparks NHC. 2001. Designer eggs: from improvement of egg composition to functional food. *Trends in Food Sci. Tech.* 12:7-16.
- Takahashi K, Ichioka K, Hatano M, and Zama K. 1985. Seasonal variation of sardine (*Sardinops melanosticta*) muscle lipids and other components. *Bull Fac Fish Hokkaido Univ* 36:248-257.
- UNA. 2012. *Compendio de Indicadores Económicos del Sector Avícola*. Unión Nacional de Avicultores. Dirección de Estudios Económicos. México D.F.
- Van Elswyk ME 1997a. Comparison of n-3 fatty acid sources in laying hen rations for improvement of whole egg nutritional quality: a review. *Brit J Nutr*. 78, Suppl. 1, S61-S69.
- Van Elswyk ME, Sams AR and Hargis PS. 1992. Composition, functionality, and sensory evaluation of eggs from hens fed dietary menhaden oil. *J Food Sci* 57:342-349.
- Van Elswyk M, Dawson P, Sams A. 1995. Dietary menhaden oil influences sensory characteristics and headspace volatiles of shell eggs. *J Food Sci* 60: 85-89.
- Watkins B, Elkin R. 1992. Dietary modulation of oleic and stearic acids in egg yolks. *J Food Comp Anal* 5: 209-215.
- Yalcyn H, Unal MK, Basmacyoolu H. 2007. The fatty acid and cholesterol composition of enriched egg yolk lipids obtained by modifying hens diets with fish oil and flaxseed. *Grasas y Aceites* 58: 372-378.
- Yannakopoulos A. 2007. Egg enrichment in omega-3 fatty acids. In: *Bioactive Egg Compounds*. Rainer H, R López-Fandiño, M Anton, R Schade (eds). Springer-Verlag Berlin Heidelberg, Pp 159-170.
- Yu MM, Sim JS. 1987. Biological incorporation of n3 polyunsaturated fatty acids into chicken eggs. *Poult Sci* 66: (Suppl. 1): 95 (Abstr).

6.2 Efecto sobre la composición en ácidos grasos, características sensoriales y estabilidad oxidativa del huevo al suplementar la dieta para gallinas con **aceite de sardina y vitamina E**

Efecto sobre la composición en ácidos grasos, características sensoriales y estabilidad oxidativa del huevo al suplementar la dieta para gallinas con aceite de sardina y vitamina E

Resumen

El objetivo de este estudio fue determinar si adicionando vitamina E (VE) a dietas suplementadas con aceite de sardina (AS) se corrigen los problemas observados en la producción de huevo y se reduce el riesgo de pérdida y oxidación de los ácidos grasos omega 3 (AGn3) en el huevo. Para ello se utilizaron 180 gallinas Bovans White de 75 semanas de edad, con 5 réplicas de 12 aves cada una, constituyendo cada réplica la unidad experimental. A cada grupo de gallinas le fue asignada aleatoriamente uno de los tres tratamientos: T1-dieta base (DB), T2-DB+2.5% de aceite de sardina (AS), T3-DB+2.5%AS+100mg/kg de vitamina E (VE). El ensayo tuvo una duración de 4 semanas, con una semana previa de acostumbramiento. Agua y alimento fueron suministrados *ad libitum*. Se midieron las variables productivas, la calidad física del huevo y se evaluó sensorialmente el sabor del huevo. La concentración de ácidos grasos (AG) en el huevo y el grado de oxidación de los mismos se midió a los 0, 30 y 60 días de almacenamiento a temperatura ambiente (20 C). Los resultados mostraron una reducción en la producción (84 vs 77%) y masa del huevo (57 vs 52g) al suplementar la dieta con 2.5%AS ($P < 0.05$), y un incremento en la coloración de la yema ($P < 0.05$) (9 vs 10 abanico Roche); sin embargo, la adición de 100 mg/kg de VE a la dieta no afectó en forma alguna estas variables ($P > 0.05$). El sabor del huevo no se vio afectado en ningún caso ($P > 0.05$). La concentración de los AGn3 en el huevo, principalmente del eicosapentaenoico (EPA) y del docosahexaenoico (DHA), aumentó significativamente al suplementar la dieta con AS (1.6 vs 4.3 % del total de ácidos grasos) mientras que la relación n6:n3 se redujo significativamente (11.4 vs 2.4) ($P < 0.05$); estos valores se mantuvieron constantes durante los 60 días de almacenamiento ($P < 0.05$), aun sin la adición de la VE. La formación de malonaldehído (MDA) en el huevo aumentó con la adición de AS en la dieta y con el tiempo de almacenamiento, aun con la adición de 100 mg/kg de VE ($P < 0.05$). Se concluye que incluir hasta 2.5% de AS en la dieta aumenta significativamente el contenido de AGn3 en el huevo y reduce la relación n6:n3 en el mismo, lográndose mantener estas características hasta por 60 días a temperatura ambiente, aun sin la adición de VE en la dieta.

Palabras clave: vitamina E, aceite de sardina, ácidos grasos omega 3, estabilidad oxidativa, gallinas.

Introducción

En virtud de los múltiples beneficios que los ácidos grasos omega 3 (AGn3) aportan a la salud, existe hoy un gran interés en hacer llegar a los consumidores este tipo de compuestos bioactivos (Burgess et al. 2000; Stak, 2000; Goodfellow, 2000; Kris-Etherton et al. 2002; Helland et al. 2003; Chow, 2008; Simopoulos, 2008). El huevo ha resultado ser un excelente vehículo para lograr este objetivo, ya que es uno de los alimentos de mayor consumo por su excelente valor nutritivo, por su precio que lo hace asequible a toda la población, por su versatilidad para ser preparado en muy diferentes formas, y por muchas otras razones mas (Farrel, 1998; Surai y Spark, 2001; Lewis et al. 2000; Torre-Marina et al. 2012).

Con la finalidad de producir huevos con un alto contenido de AGn3, diversos ingredientes han sido utilizados en la dieta de las gallinas (García y Albalá, 1998; González-Esquerro y Leeson, 2000, 2001; Bourre, 2005; Carrillo et al. 2005; Yalcyn et al. 2007; Yannakopoulos, 2007; Kralik et al. 2008; Kouba y Mourot, 2011). En particular, los aceites de pescado han sido de gran interés por su alto contenido de los ácidos eicosapentaenoico (EPA) y docosahexaenoico (DHA) (Hargis and Van Elswyk, 1993; Castillo-Badillo et al. 2005; Cachaldora et al. 2006; Cornejo et al. 2008).

Sin embargo, esta misma característica hace a los aceites de pescado altamente susceptibles a la oxidación lipídica, una de las principales vías de deterioro de los alimentos que, por lo general, deriva en una pérdida de la calidad comercial, organoléptica y sanitaria del alimento (Bailey, 1984; Eskin y Robinson, 2001).

En vista de ello, se ha considerado apropiado agregar antioxidante a las dietas suplementadas con aceites de pescado (AP) a fin de reducir el riesgo de una lipoperoxidación y en consecuencia la pérdida o descomposición de los ácidos grasos, particularmente los de cadena larga. El antioxidante mas comúnmente utilizado ha sido la vitamina E (VE) (Chen et al. 1998; Huerta et al. 2005; Surai et al. 2007). Sin embargo, autores como Melluzzi et al. (2000) no encontraron efecto alguno sobre la composición de AG en el huevo cuando agregaron 50 y 100 mg/kg de vitamina E a dietas suplementadas con 3% de AP y que por lo contrario, con 200 mg/kg de vitamina E la concentración de los AGn3 en el huevo se redujo. De la misma manera, Cherian et al. (1996) encontraron que

adicionar cantidades altas de vitamina E (367-423 ug/g) a dietas suplementadas con 3.5% de AP redujo la concentración de AGn3 en el huevo

Por lo tanto, el objetivo de este estudio fue determinar si la composición en ácidos grasos, características sensoriales y estabilidad oxidativa del huevo se ve afectada, al agregar 100 mg/kg de vitamina E a dietas suplementadas con 2.5% de aceite de sardina y al mantener el huevo almacenado por un periodo de 60 días a temperatura ambiente.

Materiales y Métodos

Obtención del aceite de pescado y de la vitamina E

El aceite de sardina (AS) empleado en el estudio se obtuvo en una planta procesadora de harinas de pescado en Guaymas, Sonora, México. Estaba estabilizado con 200 ppm de butilhidroxitolueno (BHT), pero no estaba deodorizado, refinado ni blanqueado. Se mantuvo en refrigeración y en oscuridad hasta el momento de ser utilizado. La vitamina E empleada para el presente estudio fue grado alimenticio (Lutavit E 50% BASF Mexicana SA).

Formulación y preparación de las dietas

La dieta base se formuló con el programa Nutrion Windows™ (Versión 5.0 Pro), cubriendo las necesidades nutrimentales establecidas por el National Research Council (NRC 1994) para gallinas ponedoras, con 15% de proteína cruda y 2785 kcal de energía metabolizable. Fue elaborada con base sorgo-soya y sin antioxidante (Cuadro 10). Esta dieta fungió como testigo (T1), mientras que de las dietas experimentales una fue suplementada con 2.5% AS (T2), en sustitución del aceite de soya; y a la otra se le adicionaron, además del aceite de sardina, 100mg/kg vitamina E (T3).

Cuadro 10. Composición porcentual de la dieta base

Ingrediente	kg
Sorgo grano	61.8
Pasta de soya	20.4
Carbonato de calcio	12.4
Aceite de soya	2.50
Ortofosfato 1820 ¹	1.55
Sal (NaCl)	0.45
L-Lisina HCL	0.35
Avelut polvo 15 ²	0.10
Toxisorb	0.10
Alimet 88%	0.08
Avired ³	0.08
Premezcla mineral ⁴	0.05
Cloruro de colina 60	0.05
Premezcla vitamínica ⁵	0.05
Bacitracina	0.03
L-treonina	0.03
Antioxidante	0.00
Total	100.02
Aporte calculado	
Energía Metabolizable (Mcal/kg)	2.75
Proteína cruda %	15.32
Metionina %	0.33
Met + Cis %	0.58
Lisina %	1.02
Treonina	0.63
Calcio total %	4.85
Fósforo disponible %	0.41
Sodio %	0.18
Cloro %	0.40
Colina mg/kg	1260.69

¹ Fosfato monobásico P 21% min, Ca 18% min, F 0.21% max, humedad 5% max.

² Fuente natural de xantófilas amarillas (Flor de cempasúchitl) 15 g/kg

³ Pigmento vegetal rojo: Lucantin Red como fuente de cantaxantina, 5 g carotenoides total /kg

⁴ Minerales (mg/kg dieta): Mn 120; Zn 100; Fe 120; Cu 12; I 0.7; Se 0.4; Co 0.2; excipiente, c.b.p. 1 000

⁵ Vitaminas (por kg): A, 10 000 000 IU; D₃, 3 000 000 IU; E, 20 000 IU; K₃, 2.500 g; Tiamina, 2.500 g; Riboflavina, 5 g; Niacina, 35 g; Acido pantotenico, 10 g; Piridoxina, 4 g; Acido folico, 1 g; Cianocobalamina, 10 mg; Biotina, 200 mg; excipiente cbp 1 000.

Las dietas se prepararon cada semana, primero en una mezcladora de gusano sinfín con capacidad para 120 kg/5 minutos, y posteriormente en una mezcladora de listón (Howes Co Inc model 152 M) por 3 minutos a 75 rpm.

Análisis de la composición de ácidos grasos en los aceites y dietas

En el caso de las dietas y de los aceites, previo al análisis de ácidos grasos, se hizo una extracción de lípidos con cloroformo:etanol (1:1) (AOAC 2000, método 923.07). El extracto lipídico de las dietas y de los aceites, fue metilado con trifluoruro de boro al 20% en una solución metanólica al 2% (AOAC 2000, método 969.33). Las muestras se inyectaron en un cromatógrafo de gases Varian, modelo 3380 CX equipado con un automuestreador CP8400, detector de ionización de flama y columna DB23 de 30 m con un d.i. de 0.25mm. Se utilizó al nitrógeno como gas acarreador a un flujo de 30 mL/min. Las temperaturas utilizadas fueron: columna 230°C, inyector 150°C, detector 300°C. Para calcular la concentración de ácidos grasos se utilizó como patrón de referencia una mezcla de estándares de ácidos grasos con concentraciones conocidas (SupelcoTM 37 FAME Mix SIGMA). El ácido miristoleico fue utilizado como estándar interno. La integración de los resultados se hizo mediante el programa Star Chromatography Workstation vs 6.3 Varian Associates, Inc. Los resultados se reportan en porcentaje del total de ácidos grasos (%TAG) (Cuadro 11).

Medición de las variables productivas

El ensayo experimental con las aves tuvo lugar en el Centro Experimental de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia (UNAM), ubicado en Santiago, Zapotitlán, Delegación Tlahuac, Distrito Federal. El clima de la región es templado subhúmedo, con una precipitación anual de 747 mm, siendo enero el mes mas frío y mayo el más caluroso. Para cada tratamiento se utilizaron 60 gallinas Bovans White de 75 semanas de edad, con 5 réplicas de 12 aves cada una, constituyendo cada réplica la unidad experimental. A cada grupo de gallinas le fue asignada aleatoriamente una de las dietas experimentales. El ensayo tuvo una duración de 4 semanas, con una semana previa de acostumbramiento y un

Cuadro 11. Composición en ácidos grasos de los aceites y las dietas

Acido graso (% TAG)	Aceite de soya	Aceite sardina	Dieta testigo	Dieta con AS	Dieta AS+VE
Mirístico (C14:0)	0.11	6.09	0.24	3.46	3.60
Palmitico (C16:0)	10.77	18.54	13.03	17.01	16.80
Heptadecanoico (C17:0)	0.10	0.56	0.12	0.35	0.36
Estearico (C18:0)	4.22	3.82	3.86	3.27	3.09
Araquidico (C20:0)	0.31	0.29	0.26	0.22	0.22
Total AGS	15.51	29.30	17.51	24.31	24.07
Palmitelaidico (C16:1)	0.00	0.13	0.08	0.10	0.09
Palmitoleico (C16:1)	0.18	7.47	0.44	4.11	4.12
cis10-heptadecenoico (C17:1)	0.07	0.99	0.07	0.29	0.35
Oleico (C18:1)	21.91	12.20	27.78	20.41	20.35
cis-vaccenico (C18:1)	0.83	3.06	0.72	2.23	2.22
Eicosenoico (C20:1)	0.22	2.17	0.28	1.32	1.15
Total AGM	23.21	26.02	29.37	28.45	28.28
Linoléico (C18:2 n6 LA)	53.23	13.70	43.71	20.36	21.89
Gama-linolénico (C18:3 n6 GLA)	0.06	0.31	nd	0.14	0.15
Alfa-linolénico (C18:3 n3 ALA)	6.95	0.99	4.54	1.60	1.57
CLA c9,t11 y c11,t9 (C18:2)	0.03	2.55	nd	1.33	1.36
CLA t10,c12 (C18:2)	0.00	0.29	nd	0.09	0.12
cis-11,14-eicosadienoico (C20:2)	0.05	0.25	0.04	0.11	0.10
cis-11,14,17eicosatrienoico (C20:3)	0.10	0.18	0.04	0.06	0.04
Araquidónico (C20:4 n6 AA)	0.00	0.75	0.19	0.45	0.41
Eicosapentaenoico (C20:5 n3 EPA)	0.40	14.20	0.30	8.05	8.07
Docosapentaenoico (C22:5 n3 DPA)	0.00	1.57	nd	1.08	1.07
Docosahexaenoico (C22:6 n3 DHA)	0.04	10.26	0.07	6.11	6.05
Total AGPI	60.86	45.05	48.89	39.38	40.83
Total n6	53.29	14.76	43.90	20.96	22.45
Total n3	7.39	27.02	4.91	16.83	16.76
n6:n3	7.2:1	0.6:1	8.9:1	1.2:1	1.3:1
Lípidos totales (g/100g)			4.35	4.25	4.43

El total de estos valores no da 100% porque ácidos grasos menores no están reportados.

TAG- Total de ácidos grasos AGS - Ácidos grasos saturados, AGM- Ácidos grasos monoinsaturados, AGPI- Ácidos grasos poliinsaturados

programa de 16 horas de luz. Agua y alimento fueron suministrados *ad libitum*. Se llevó un registro diario del consumo de alimento, producción de huevo y peso del huevo. Al final de cada semana se hizo un resumen semanal de las variables antes mencionadas, así como, de la masa de huevo y conversión alimenticia.

El estudio se condujo en conformidad con las políticas establecidas por el Comité de Ética para el Cuidado de los Animales, de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Nacional Autónoma de México.

Evaluación del color de la yema con el Abanico Roche

Al final de la cuarta semana de experimentación se tomaron al azar 25 huevos de cada tratamiento (5 por réplica) para medir el color de la yema, de acuerdo a los valores del abanico colorimétrico Roche, cuyos valores van del 1 al 15, correspondiendo el número 1 a un color amarillo muy pálido y el 15 a un amarillo-naranja muy intenso.

Evaluación sensorial del huevo

Al final de las cuatro semanas de experimentación, se realizó una prueba de evaluación sensorial en cabinas individuales en el Laboratorio de Evaluación Sensorial del Depto. de Ciencia y Tecnología de los Alimentos del INCMNSZ. Se aplicó una prueba afectiva para medir el grado de aceptación por el sabor del huevo y el color de la yema (Anzaldúa-Morales, 1994). En los dos casos se utilizó una escala ordinal de cinco puntos. Participaron 30 jueces no entrenados, de ambos sexos, consumidores habituales de huevo.

a) Sabor del huevo

De cada tratamiento se tomaron al azar 8 huevos, se revolviaron y frieron en una sartén con aceite en aerosol (PAM^{MR}). En ninguno de los casos se adicionó sal u otro sazoador. A cada tratamiento se le asignó una clave de tres dígitos, tomados de una tabla de números aleatorios (Meilgaard et al. 1999).

En una charola, se colocó un plato con las diferentes muestras de huevo revuelto, junto con una pieza de pan blanco y un vaso de agua (que entre muestra y muestra debería consumir el panelista a fin de eliminar sabores residuales) y un cuestionario para indicar el

grado de aceptación para cada una de las muestras. Dentro de la cabina se utilizó luz roja para evitar que el panelista se dejará influir por el color del huevo al evaluar el sabor del mismo.

b) Color de la yema

Se tomó un huevo de cada tratamiento, cada yema se colocó en recipientes de plástico transparente sobre un fondo blanco, asignando a cada yema una clave de tres dígitos (diferente a la empleada en la evaluación del sabor), tomados de una tabla de números aleatorios (Meilgaard et al. 1999).

A cada panelista se le entregaba una charola con las yemas de los diferentes tratamientos a evaluar. Junto con ello se les daba un cuestionario donde indicaban el grado de aceptación por el color de la yema de cada tratamiento, de acuerdo a la escala de cinco puntos que ahí se señalaban. Dentro de la cabina se utilizó luz blanca.

Se cerró la ventanilla de la cabina (para permitir la concentración del panelista) y se esperó la señal (luz de color rojo) que indicaba que había concluido su evaluación. En ese momento se abría la ventanilla para recoger los cuestionarios.

Análisis de la composición en ácidos grasos del huevo

Al final de la cuarta semana de experimentación se tomaron al azar 30 huevos de cada tratamiento (6 por réplica). 10 de ellos se mezclaron con una batidora para formar un “pool”, de allí se tomaron 10 alícuotas de 1 g para realizar la extracción lipídica con cloroformo:etanol (1:1) (AOAC 2000, método 923.07) y metilar los ácidos grasos con trifluoruro de boro al 20% en una solución metanólica al 2% (AOAC 2000, método 969.33) (Anexos 10.3 y 10.4). Las 20 piezas restantes de cada tratamiento, se conservaron a temperatura ambiente (20°C), para efectuar estos mismos análisis a los 30 y 60 días siguientes. Las muestras se inyectaron en un cromatógrafo de gases Varian, modelo 3380 CX equipado con un automuestreador CP8400, detector de ionización de flama y columna DB23 de 30 m con un d.i. de 0.25mm.

Determinación de la oxidación lipídica mediante la prueba de TBARS

En la cuarta semana de experimentación se tomaron de cada tratamiento 30 huevos. Al siguiente día, después de la recolección, a 10 de ellos se les determinó el grado de oxidación lipídica en yema, utilizando el método del ácido tiobarbitúrico (TBARS) (Salih et al. 1987; Botsoglou et al.1994). Las 20 piezas restantes se conservaron a temperatura ambiente (20°C), para efectuar el mismo análisis (n=10) a los 30 y 60 días siguientes.

Diseño Experimental del Estudio

El estudio fue prospectivo, comparativo y experimental. El modelo estadístico utilizado para las variables productivas y el color de la yema fue conforme a un diseño completamente al azar, siendo el siguiente:

$$Y_{ij} = \mu + T_i + \xi_{ij} \quad \text{donde:}$$

Y_{ij} = Valor de la variable de respuesta en el tratamiento i , repetición j .

μ = media general

T_i = Efecto del tratamiento i .

ξ_{ij} = Error experimental del i -ésimo tratamiento de la j -ésima repetición.

El diseño empleado para la concentración de lípidos totales, ácidos grasos y malonaldehído (MDA) en el huevo, fue uno completamente al azar, con arreglo factorial 2x3, donde los factores a considerar fueron la dieta (testigo y experimental) y el tiempo de conservación del huevo (0, 30 y 60 d) a temperatura ambiente. El modelo estadístico asociado a este diseño fue el siguiente:

$$Y_{ijk} = \mu + A_i + B_j + A_i*B_j + \xi_{ijk}$$

donde:

Y_{ijk} = Variable de respuesta debido al efecto de la dieta y el tiempo de conservación

μ = media general

A_i = Efecto de la i -ésima dieta

B_j = Efecto del j -ésimo tiempo de conservación

A_i*B_j = Interacción entre la dieta y el tiempo de conservación

ξ_{ijk} = Error experimental del i -ésimo tratamiento de la j -ésima repetición.

Análisis estadístico

Los datos de las variables productivas y el color de la yema se analizaron mediante un análisis de varianza para un diseño completamente al azar y la comparación de las medias se realizó con la prueba de Tukey ($P < 0.05$), utilizando el PROC ANOVA de SAS (SAS, 2008).

Los datos obtenidos en la prueba de evaluación sensorial se analizaron mediante la prueba no paramétrica de rangos de Wilcoxon con una significancia de 0.05 (SAS, 2008).

Los datos de las variables: concentración de lípidos totales, ácidos grasos y MDA en el huevo se analizaron conforme a un diseño completamente al azar con arreglo factorial 2x3, siendo un factor la dieta y el otro el tiempo. Se utilizó el PROC GLM de SAS (SAS, 2008) para el análisis de los datos. La comparación entre medias se hizo con la prueba de Tukey ($P < 0.05$).

Resultados

Aceite de soya

Los AG que predominaron en este aceite fueron los poliinsaturados (AGPI), contribuyendo el ácido linoleico (C18:2 n6 LA) con 87% y el α -linolénico (C18:3 n3 ALA) con 11%; seguidos por los monoinsaturados (AGM), donde el oleico (C18:1 n9) contribuyó con 94%; y por último los saturados (AGS), en cuyo caso el palmítico (C16:0) constituyó casi el 70% del total y el esteárico 25%. Predominaron en este aceite, los n6 mas que los n3 (53% vs 7%) (Cuadro 11).

Aceite de sardina

La composición en AG de este aceite difirió considerablemente del aceite de soya. En el de sardina predominaron los n3 mas que los n6 (27% vs 15%), siendo el EPA y DHA, los AGn3 representativos de este aceite (Cuadro 11).

Composición de las dietas

En la dieta testigo (T1), predominaron los AGn6 (44%), principalmente el LA, manteniendo una relación n6:n3 muy alta de 9:1. De los AGn3, el ALA estaba presente en baja concentración (4.5%) y solo trazas de EPA y DHA (Cuadro 11).

Las dietas de los tratamientos T2 y T3, que incluían aceite de sardina, tenían una menor concentración de AGn6 que la dieta T1 (21% y 22% respectivamente vs 44%), pero una mayor concentración de AGn3 (17% y 18% respectivamente vs 5%), principalmente de EPA y DHA. En estas dietas la relación n6:n3 fue de 1:1.

Variables productivas

Adicionar 100 mg/kg de vitamina E a dietas suplementadas con 2.5% no corrigió los problemas que se observaron en las variables productivas cuando se suplementó la dieta con el aceite de pescado (como la disminución en la producción y masa de huevo y conversión alimenticia ($P > 0.05$) y el color de la yema tampoco se vio afectado en forma alguna (Cuadro 12).

Cuadro 12. Variables productivas y color de yema obtenidos al suplementar la dieta para gallinas ponedoras con aceite de sardina y vitamina E

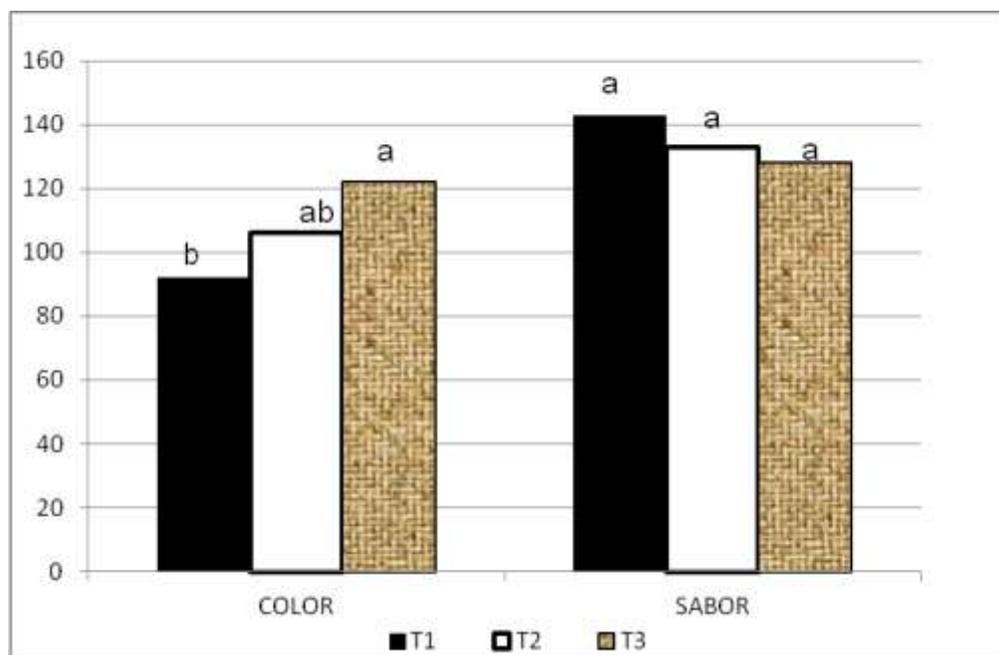
	T1	T2	T3
Consumo de alimento (g/ave/d)	115.00 ± 7.13	110.41 ± 10.26	115.11 ± 6.45
Producción de huevo (%)	84.31 ± 7.52 a	77.28 ± 7.64 b	80.14 ± 5.61 b
Peso de huevo (g)	67.25 ± 1.78	66.64 ± 4.33	65.47 ± 3.80
Masa de huevo (g)	56.77 ± 6.07	51.60 ± 6.84	52.53 ± 4.99
Conversión alimenticia	2.06 ± 0.22	2.28 ± 0.41	2.21 ± 0.28
Color de yema	8.74 ± 1.11 b	9.60 ± 0.49 a	9.72 ± 0.63 a

a, b En cada renglón, literales distintas indican diferencia estadística ($P \leq 0.05$)

T1- dieta base (DB), T2- DB + aceite de sardina, T3- DB+aceite de sardina + vitamina E

Evaluación sensorial

La aceptación por el sabor del huevo no se vio afectado por la adición de VE ($P > 0.05$) a la dieta suplementada con AS, pero el color de la yema sí ($P < 0.05$). Los panelistas mostraron una mayor aceptación por el color de la yema cuando la VE fue adicionada a la dieta suplementada con AS. En comparación con las yemas del tratamiento con solo la DB, estas últimas les parecieron más pálidas (Figura 13).



^{a,b} En cada variable, literales distintas indican diferencia estadística ($P < 0.05$)

T1- dieta base (DB), T2- DB + aceite de sardina, T3- DB +aceite de sardina + vitamina E

Figura 13. Aceptación por el color de la yema y sabor del huevo cuando a la dieta suplementada con aceite de sardina se le adicionó vitamina E (total de puntos)

Ácidos grasos en el huevo

El contenido de lípidos totales en el huevo permaneció constante en todos los tratamientos ($P > 0.05$) a lo largo de los 60 días en que éste se mantuvo conservado a temperatura ambiente (Cuadro 13). Excepto en el T3 que presentó el valor mas bajo en el día 0.

La concentración total de AGS en T1 (DB) prácticamente permaneció sin cambio durante los 60 días ($P > 0.05$). En T2 (DB+AS), disminuyó 1.3% a los 60 días, con respecto al día 30 ($P < 0.05$). En T3, la concentración total de los AGS a los 60 días se incrementó 3.5% con respecto al día 30 ($P < 0.05$), dicho incremento estuvo dado principalmente con el ácido palmítico (Cuadro 13).

En el caso de los AGM, la concentración en la yema de T1 fue superior en el día 60, con respecto al día 0 ($P < 0.05$). Cuando la dieta fue suplementada con AS (T2) el contenido

de los AGM no difirió significativamente durante los 60 días de conservación ($P>0.05$), excepto el ácido palmítico, el cual se redujo a los 30 y 60 días de conservación ($P<0.05$). Sin embargo, cuando a esta dieta se le adicionó VE, la concentración total de AGM se redujo significativamente el día 60, con respecto al día 0 ($P<0.05$), particularmente en el ácido oleico la reducción fue de 6.3% ($P>0.05$).

En el caso de los AGPI, hubo una reducción en la concentración de los ácidos linoleico, γ -linolenico y α -linolenico ($P<0.05$), a los 60 d de conservación en T1. El resto de los AG no mostraron cambios significativos a lo largo del periodo ($P>0.05$). Cuando la dieta fue suplementada con AS, la concentración de los AGPI en general mostró los valores mas altos en el día 60 ($P<0.05$), y este mismo comportamiento se observó cuando VE fue adicionáda a esta dieta ($P<0.05$).

La concentración de AGn3 en el huevo se incrementó mas de un 250% cuando la dieta fue suplementada con AS ($P<0.05$), y fue todavía aun mayor la concentración en la yema, cuando la VE fue adicionada a la dieta ($P<0.05$).

La relación n6:n3 en el huevo, se redujó significativamente cuando la dieta fue suplementada con AS, pasando de 11:1 a 2:1 ($P<0.05$) y cuando se adicionó VE la relación continuó siendo de 2:1. La relación n6:n3 permaneció constante durante todo el periodo de 60 días, en cada uno de los tratamientos ($P<0.05$).

Cuadro 13. Contenido de lípidos totales y ácidos grasos en el huevo conservado durante varios días a temperatura ambiente al suplementar la dieta para gallinas ponedoras con aceite de sardina y vitamina E en forma combinada

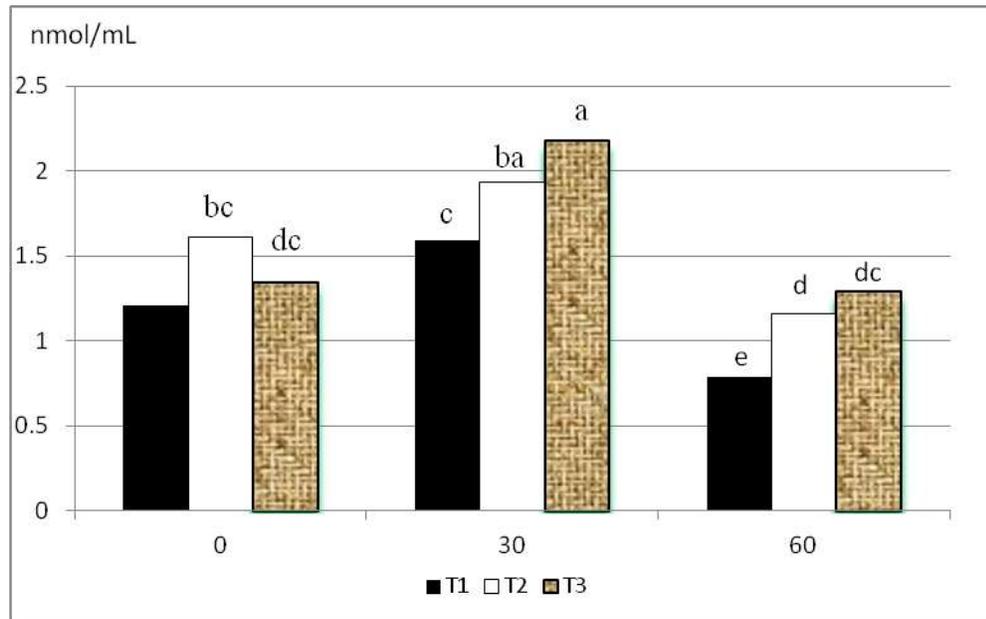
Componente químico	T1			T2			T3		
	0	30	60	0	30	60	0	30	60
Lípidos totales (g/100g) ¹	11.74 ba	11.49 ba	11.34 b	11.41 ba	11.58 ba	11.60 ba	10.71 c	11.91 a	11.82 ba
Acidos grasos (%TAG) ²									
Mirístico (C14:0)	0.34 f	0.38 e	0.35 fe	0.48 d	0.54 bc	0.52 c	0.48 d	0.56 ba	0.57 a
Palmítico (C16:0)	24.62 f	24.88 e	24.89 e	26.90 a	26.40 b	26.06 c	25.76 d	25.72 d	26.81 a
Esteárico (C18:0)	8.57 b	8.88 a	8.45 cb	7.95 f	8.31 cde	8.22 de	8.34 cd	8.15 e	8.27 de
Total AGS	33.53 f	34.14 e	33.69 f	35.34 b	35.25 b	34.80 c	34.58 dc	34.43 d	35.65 a
Palmitoleico (C16:1)	2.33 g	2.34 g	2.55 f	3.61 a	3.31 d	3.40 c	3.24 ed	3.22 e	3.52 b
Oleico (C18:1)	40.90 c	40.93 c	42.15 b	42.66 b	42.63 b	42.64 b	43.97 a	43.42 a	41.18 c
Cis-vaccénico (C18:1)	1.57 bc	1.50 c	1.47 c	1.87 a	1.71 ba	1.80 a	1.76 ba	1.72 ba	1.89 a
Total AGM	44.80 e	44.77 e	46.17 d	48.14 bc	47.65 c	47.83 bc	48.96 a	48.36 ba	46.59 d
Linoleico (C18:2 LA)	15.95 a	16.03 a	13.9 b	9.46 d	9.85 c	9.52 d	8.95 e	9.07 e	9.76 dc
γ-linolénico (C18:3 GLA)	0.13 b	0.15 a	0.04 f	0.06 dc	0.05 de	0.05 fe	0.06 d	0.06 de	0.08 c
α-linolénico (C18:3 ALA)	0.65 a	0.67 a	0.52 b	0.37dc	0.38 c	0.37 dc	0.33 d	0.36 dc	0.38 c
Araquidónico (C20:4 AA)	1.82 ba	1.80 b	1.90 a	0.65 c	0.63 c	0.71 c	0.69 c	0.69 c	0.70 c
Eicosapentaenoico (C20:5 EPA)	0.00 f	0.04 e	0.02 e	0.41 d	0.39 d	0.53 b	0.50 c	0.50 c	0.57 a
Docosapentaenoico (C22:5 DPA n6)	0.33 a	0.31 b	0.35 a	0.03 c	0.00 d	0.03 c	0.03c	0.03 c	0.03 c
Docosapentaenoico (C22:5 DPA n3)	0.11 e	0.11 e	0.12 e	0.35 d	0.38 c	0.39 bc	0.42 a	0.40 ba	0.40 b
Docosahexaenoico (C22:6 DHA n3)	0.84 d	0.85 d	0.92 d	3.12 c	3.08 c	3.26 bc	3.17 bc	3.38 ba	3.58 a
Total AGPI	19.84 a	19.95 a	17.77 b	14.46 ef	14.76 ed	14.85 d	14.14 f	14.49 edf	15.49 c
Total n6	18.24 a	18.29 a	16.18 b	10.20 d	10.53 c	10.30 dc	9.73 e	9.85 e	10.57 c
Total n3	1.60 e	1.66 e	1.59 e	4.26 d	4.23 d	4.55 cb	4.42 cd	4.64 b	4.92 a
n6:n3	11.41 a	11.03a	10.20 b	2.42 c	2.50 c	2.27 c	2.23 c	2.12 c	2.15 c

¹ en 100 g de huevo completo (yema+clara), ² TAG=total de ácidos grasos

a, b, c, d,e,f En cada renglón, literales distintas indican diferencia estadística (P≤ 0.05)
T1- dieta base (DB), T2- DB + aceite de sardina, T3- DB + aceite de sardina + vitamina E

Malondialdehido (MDA) en yema

Independientemente de que las dietas hayan sido o no suplementadas con AS, hubo formación de MDA en la yema desde el primer día en que se mantuvo el huevo conservado a temperatura ambiente ($P < 0.05$). A los 30 días la concentración de este compuesto en todos los tratamientos aumentó en forma significativa ($P < 0.05$); sin embargo, en los dos tratamientos donde la dieta había sido suplementada con AS, la concentración de MDA fue aun mayor ($P < 0.05$). Adicionar vitamina E no redujo la formación de MDA en el huevo ($P < 0.05$). Contrario a lo esperado, a los 60 días, la concentración de MDA disminuyó significativamente en los tres tratamientos, con respecto a los días 0 y 30 ($P < 0.05$) (Figura 14).



^{a,b} En cada variable, literales distintas indican diferencia estadística ($P < 0.05$)

T1- dieta base (DB), T2- DB + aceite de sardina, T3- DB +aceite de sardina + vitamina E

Figura 14. Concentración de MDA (nmol/mL) en la yema de huevos conservados durante varios días a temperatura ambiente al suplementar la dieta de las gallinas con aceite de sardina junto con vitamina E

Discusión

Aceite y Dietas

El perfil de AG del aceite de sardina (AS) utilizado en el presente estudio, resultó similar a lo reportado por otros autores (Gámez-Meza et al. 1999; Ackman, 2005; Bandarra et al. 2007; Noriega-Rodríguez et al. 2009).

El hecho de que el AS tuviera mas EPA (C20:5 n3) que DHA (C22:6 n3) concuerda con lo hallado por otros autores en especies grasosas semejantes a la sardina, tal es el caso de los aceites crudos de sábalo (EPA fluctua entre 11.1% - 16.3% y el DHA de 4.6% - 13.8%), de arenque americano (EPA varia entre 3.9 - 15.2% y DHA 2.0 -7.8%) (Stansby, 1991); de anchoas (EPA 22% y DHA 9%) y de menhaden (EPA 21% y DHA 7%). Los aceites de atún por lo contrario, tienen más DHA (21%) que EPA (8%) (Bimbo, 1999; Cachaldora et al. 2006).

En consecuencia, y como era de esperarse, las dos dietas que incluían aceite de sardina, tenían mas EPA (3.6-3.9%) que DHA (0.43-0.51%).

Variables productivas

Los resultados obtenidos al suplementar la dieta con AS, concuerdan con lo informado por Cachaldora et al. (2006,2007), quienes no encontraron efecto alguno sobre el consumo de alimento y peso del huevo al suplementar la dieta de las aves con diferentes tipos de aceites de pescado y diferentes niveles de inclusión del mismo (1.5%, 3%, 4.5% y 6.0%).

Cornejo et al. (2008) y Cherian et al. (2007) no encontraron cambios en las variables productivas al incorporar 6% de AP en el primer caso; así como 0.25% y 0.5% de AP en el segundo caso. Pappas et al. (2006) observaron una reducción en el peso del huevo al suministrar a las aves, dietas suplementadas con 5.5% de aceite de pescado. Cherian (2008) informa un decremento en el peso del huevo y en el color de la yema al adicionar 3.5% de aceite de pescado a la dieta.

Otros autores observaron una reducción tanto en la producción como en el peso del huevo, al suplementar la dieta para gallinas ponedoras con aceite de pescado (Hargis y Van Elswyk, 1993; Cloughley et al.1997; Maurice, 1994; González-Esquerria y Leeson, 2001;

Surai y Spark, 2001), con 4.8% de una microalga marina con alto contenido de DHA (Herber–McNeill y Van Elswyk, 1996), y cuando han utilizado al cebo (5 a 7%) como única fuente de grasa en dietas para gallinas ponedoras (Watkins y Elkin 1992, Grobas et al. 2001, González-Muñoz et al. 2009).

Algunos autores atribuyen estos efectos al hecho de que los AGn3 reducen la cantidad de lípidos y estradiol en suero (lo que limitaría la disponibilidad de lípidos para la formación de yema) (Van Elswyk 1997a; González-Esquerri y Lesson, 2001; Cachaldora et al. 2006); o al hecho de que al suministrar en la dieta ingredientes con alto contenido de AGn3, se reduce en el plasma la concentración del ácido linoleico (C18:2 n6), el cual es de gran importancia en la producción de la PGE₂, hormona involucrada en el proceso reproductivo (Hertelendy and Biellier, 1978; Hudelson and Hudelson, 1996; Simopoulos, 2006, 2008; Lee y Hwang, 2008).

Otros autores también han sugerido, que al suplementar las dietas con aceite de pescado con el fin de enriquecer el huevo con AGn3, las reservas naturales de vitamina E (vitamina relacionada estrechamente con el proceso reproductivo) en el ave, se agotan rápidamente ya que estos AGn3 son mas proclives a la oxidación y en consecuencia el ave hace uso de toda la vitamina E para protegerlos. Por lo que sugieren aumentar la cantidad de vitamina E en la dieta cuando esta es suplementada con aceites de pescado (Surai y Spark, 2000; Surai, 2003).

En el presente estudio, adicionar vitamina E a la dieta con AS no contribuyó en forma alguna a corregir los problemas observados en la producción de huevo, lo que concuerda con lo informado por Melluzzi et al. (2000) quienes tampoco observaron mejora alguna en las variables productivas, cuando suministraron a gallinas ponedoras dietas suplementadas con 3% de aceite de pescado y vitamina E en tres diferentes concentraciones (50, 100 y 200 mg/kg).

Coloración de la yema

El aumento en la coloración de la yema cuando la dieta fue suplementada con AS, seguramente se debió a la presencia de pigmentos en el aceite de pescado, los cuales varían de acuerdo a la alimentación de los peces (Bailey, 1984; Roldan-Libenson et al. 1999). En

el caso de la sardina, su principal alimento es el fitoplancton (Cellamare y Gómez, 2007), el cual posee pigmentos tales como clorofila, antocianinas, luteína, diatoxantina, diadinoxantina, prasinoxantina, fucoxantina, peridinina, zeaxantina y violaxantina (Millan et al. 2004). Por lo tanto, en el aceite de sardina seguramente estos pigmentos estaban presentes y las xantofilas fueron depositadas en la yema de huevo.

Esto es de gran interés no solo para el avicultor sino también para el consumidor, ya que como señala Clydesdale (1998) la apariencia visual, especialmente el color, es la característica más importante de los alimentos que determina ser seleccionado para su consumo. Sin embargo, los beneficios de incrementar la coloración de la yema a través de carotenoides naturales van más allá del atractivo visual. Estudios realizados por Chung et al. (2004) y Goodrow et al. (2006) revelan que los pigmentos presentes en la yema de huevo, principalmente luteína y zeaxantina, tienen una alta biodisponibilidad en el humano y son importantes en la prevención de cataratas y degeneración macular en la retina.

Por otra parte, el hecho de que las yemas hayan estado más pigmentadas en los dos tratamientos que incluían AS es un aspecto positivo que indica que dicho aceite estaba en buenas condiciones; ya que cuando existe un proceso de oxidación, las propiedades cromógenas pueden reducirse, pues los carotenoides están formados por cadenas hidrocarbonadas altamente insaturadas (Bailey, 1984; Clydesdale, 1998).

El haber adicionado vitamina E a la dieta suplementada con AS no incrementó más la pigmentación de la yema.

Evaluación sensorial

El hecho de que no se haya detectado diferencia entre los dos tratamientos, en el grado de aceptación por el color de la yema, aun cuando las yemas del T2 (DT+AS) estaban más pigmentadas, pudiera deberse a dos razones. La primera es que la prueba utilizada era subjetiva, por lo que los resultados están dados en base a la apreciación visual de cada panelista lo que origina una amplia variación. Por lo mismo, sería recomendable aumentar el número de participantes. En segundo lugar, pudiera ser indicativo de que el aceite utilizado en el presente estudio era de buena calidad, procesado a partir de pescado fresco y estaba protegido con antioxidante.

El que no se haya afectado el sabor del huevo al suplementar las dietas con AS, concuerda con lo observado por García-Rebollar et al.(2008) cuando suplementó dietas con 1.5 y 1.7% de aceite de pescado. Pero difiere de los resultados obtenidos por Adams et al. (1989) y Van Elswyk et al. (1992), donde los panelistas detectaron un sabor desagradable cuando la dieta de las aves fue suplementada con 6% y 3% de aceite de menhaden, respectivamente. Van Elswyk et al. (1995) hallaron un mayor contenido de compuestos volátiles de bajo, más que de alto, peso molecular en huevos de gallinas cuyas dietas fueron suplementadas con aceite de menhaden, atribuyendo a estos la impartición de un sabor desagradable al producto.

González-Esquerro y Leeson (2000) hallaron que aun deodorizando el aceite de menhaden, el huevo adquiere el característico sabor a pescado. Bailey (1984) asocia el olor y sabor a pescado con la presencia de compuestos nitrogenados y glicéridos altamente insaturados y como consecuencia de la combinación química de estos compuestos, durante la oxidación de los glicéridos. También menciona que la presencia de aldehídos de peso molecular medio, en particular de los aldehídos caprílico y caprínico, formados por la oxidación y ruptura de una cadena de AG, pueden ser la causa de dichos efectos en el huevo.

Otros autores consideran que el olor y sabor a pescado que el huevo adquiere cuando la dieta de las aves es suplementada con aceite de pescado, se debe a la reducción del óxido de trimetilamina y/o a la autooxidación de los AGn3, ya que estos son muy susceptibles a oxidarse (Belitz y Grosch, 1997; Surai y Spark, 2001; Eskin y Przybylski, 2001). Este efecto no solo ha sido observado con los aceites de pescado, sino también cuando la dieta ha sido suplementada con linaza (Leeson et al. 1998; Surai y Spark, 2001).

En el presente estudio, adicionar vitamina E a las dietas suplementadas con AS no afectó de manera alguna el sabor del huevo, lo que resulta muy importante; ya que Leeson et al. (1998), encontraron que usar niveles altos de VE (100 mg/kg) en la dieta de las aves puede acentuar los sabores desagradables en el huevo, cuando la dieta de las aves es suplementada con linaza o aceites de pescado, reduciendo su aceptabilidad por parte de los consumidores.

Acidos grasos en la yema de huevo

El que la cantidad de lípidos totales en el huevo no haya sido afectada por el tipo de dieta concuerda con lo informado por Cherian *et al.* (1996), quienes al incorporar 3.5% de aceite de menhaden, aceite de palma, aceite de lino o aceite de girasol a dietas para gallinas, no observaron cambio alguno en el contenido de lípidos en la yema. De igual manera Van Elswyk *et al.* (1992) y Castillo-Badillo *et al.* (2005) no detectaron diferencias en el contenido de lípidos totales cuando suplementaron la dieta con 3% de aceite menhaden y con 1 y 2% de ceite de atún, respectivamente. Esto indica que independientemente de la fuente (vegetal o marina) que se emplee para incrementar los AGn3 en el huevo, la cantidad total de lípidos no se verá modificada, pero sí la composición en ácidos grasos.

Aunque la composición en ácidos grasos del huevo, en general, fue un reflejo de la composición de las dietas; hubieron algunas excepciones. La **primera** es que aun cuando las dietas con AS, tenían 26% menos ácido oleico que la dieta testigo, en el huevo la concentración de este AG no solo se incrementó, sino hasta superó en 4.5% mas su concentración, con respecto al huevo del T1.

El **segundo** cambio notable fue que las dietas con AS tenían 137% mas araquidónico que la dieta testigo, pero en el huevo la concentración de este ácido se redujo 64%, en comparación con T1. Melluzzi *et al.* (2000), observaron éste mismo comportamiento (25.54 vs. 67.72 mg/egg de AA) como consecuencia de la suplementación con aceite de pescado; pero también observaron un incremento de todos los ácidos grasos n-3 en la yema; particularmente EPA (19.53 vs. 0.74 mg/egg) y DHA (143.70 vs. 43.66 mg/huevo).

Un **tercer** aspecto fue que las dietas con AS existía una mayor concentración de EPA que DHA, sin embargo en el huevo sucedió lo contrario, había más DHA que EPA. Esto concuerda con lo observado por Huang *et al.* (1990) quienes informan que al suplementar la dieta de las gallinas con 3% de aceite de menhaden (11% EPA y 9% DHA), hay una mayor deposición de DHA en la yema (29 vs 192 mg de EPA y DHA respectivamente). La explicación a ello pudiera estar relacionada con el metabolismo de los AGn3 en las aves, donde al parecer existe una mayor preferencia de las enzimas para depositar DHA en los tejidos, así como una mayor eficiencia de retención del DHA en los

mismos, tal como ocurre en el humano (Spreecher et al. 1995; González-Esquerria y Lesson, 2001; Alvarez et al 2004).

Esto no quiere decir que el EPA sea menos importante, ambos cumplen funciones diferentes. A partir del EPA se forma una amplia variedad de compuestos biológicamente activos conocidos como eicosanoides (prostaglandinas y leucotrienos), potentes reguladores de la actividad biológica; este AG es capaz de ser elongado a ácido docosapentaenoico (C22:5 n3 DPA) y este a su vez a DHA (C22:6 n3). El DHA, por su parte, puede ser retroconvertido a EPA, siendo su aspecto más significativo ser el principal componente estructural en las membranas celulares del sistema nervioso y de la retina. En éstas puede constituir aproximadamente el 60% de los AGPI presentes y es tal su importancia que algunas investigaciones señalan que una deficiencia de este ácido graso puede dar origen a algunas anomalías funcionales (Rice, 1999).

El que la relación n6:n3 en el huevo se redujera notablemente al suplementar la dieta con AS, pasando de 11:1 a una de 2:1, resulta ser de gran importancia, ya que habitualmente el huevo comercial tiene una alta proporción de n6, y un bajo contenido de n3 (9:1)(Surai y Spark, 2001; Seuss-Baum, 2007), similar a una típica dieta occidental (10:1), lo cual se asocia con un incremento en el riesgo de padecer enfermedades cardiovasculares, ciertos tipos de cánceres, etc. (Gebauer et al. 2008). La relación n6:n3 recomendada en una dieta habitual va de 1:1 a 4:1 (Yannakopoulos, 2007), ya que como se sabe, los n6 y los n3, son dos clases de AGPI metabólica y funcionalmente distintos con efectos fisiológicos opuestos, por lo que mantener un balance adecuado n6:n3 es de gran importancia, ya que ambos compiten por las mismas enzimas. Al parecer, los n3 son preferidos por las enzimas delta-desaturasas (Surai y Spark, 2001).

Por otra parte, es importante señalar que la razón por la cual la cuantificación de los ácidos grasos se realizó hasta la cuarta semana fue que la incorporación de AGn3 procedentes de la dieta, en la yema es un proceso gradual. A a los 9 días de experimentación se empiezan a notar los cambios en la composición de los AG en la yema y es a partir de los 21 días que la concentración de los AG se estabiliza (Cherian, 2007; Seuss-Baum, 2007). Yu y Sim (1987) suplementaron la dieta de las gallinas con diferentes niveles de inclusión de aceite de salmón, alcanzando la máxima incorporación de los n3 a

los 8 días. Lin et al. (1995) suplementaron la dieta con 1.5% de aceite de menhaden y diariamente, por un periodo de 14 días, registraron la concentración de n3 en la yema, los resultados mostraron que a los 14 días la composición de AG en el huevo había sido modificada. Van Elswyk (1997a) alimentó a las aves con diferentes niveles de aceite de menhaden observando una deposición gradual de n3 de la semana 0 a la 3, estabilizándose el contenido y la composición entre las semanas 3 y 4. Los tratamientos con los mas altos niveles de aceite de menhaden (AMH) alcanzaron mas pronto el plateau, que los tratamientos con bajos niveles. Despues de remover las dietas experimentales, el contenido de n3 en las yemas disminuyó 20% durante las dos primeras semanas, en la tercera se mantuvo constante y en la semana 4, los tratamientos con 0.5, 1% y 1.5%, alcanzaron los mismos valores que el grupo testigo.

Adicionar vitamina E a las dietas suplementadas con AS redujo 2.15% la concentración de los AGS e incrementó la de los AGM 1.7% en el huevo. El total de AGPI y en particular los AGn3 así como la relación n6:n3 se mantuvieron sin cambio. Esto concuerdan con lo observado por Melluzzi et al. (2000) quienes tampoco encontraron efecto alguno sobre la composición de los AG en el huevo cuando adicionaron 50 ó 100 mg/kg de VE a dietas suplementadas con 3% de aceite de pescado. Algunos autores lo atribuyen al hecho de que los huevos son altamente resistentes a la oxidación lipidica porque dentro de un sistema cerrado el cual contiene en forma natural antioxidantes tales como la vitamina E, la ovotransferrina, la fosvitina, carotenoides, etc (Ping y Peng, 1985; Guerin-Dubiard et al. 2007).

Efecto del tiempo sobre la composición en AG del huevo almacenado a temperatura ambiente

La formación de MDA, tanto en el tratamiento T1 como en los que se suplementó con AS, indica que desde el momento en que el huevo se expone a factores externos como la luz y la temperatura, se inicia el proceso oxidativo. Pero el hecho de haya una mayor cantidad de MDA en el T2, también demuestra que suplementar la dieta con AS favorece aun mas la formación de radicales libres (RL), y que adicionar VE ayuda solo en un primer

momento a detener el proceso oxidativo, pues a los 30 días la concentración de MDA en el huevo del tratamiento T3 fue igual al tratamiento que tenía AS pero no VE.

Por otra parte, el hecho de que el perfil de ácidos grasos en general se haya mantenido constante durante los 60 días en que se mantuvo el huevo a temperatura ambiente (20 C) concuerda con lo señalado por otros autores quienes señalan que el perfil de AG de huevos enriquecidos con AGn3 no se altera durante el cocimiento (Van Elswyk et al.1992) o durante siete semanas de almacenamiento a 25 C (Oku et al. 1996). Aymond y Van Elswyk (1995), tampoco observaron cambios en los valores de TBARS en huevos enriquecidos con n3, cuando aceite de linaza fue incluido en la dieta de las aves, en comparación con el grupo testigo.

Otros en cambio, informan un incremento en la susceptibilidad a la oxidación durante al almacenamiento y cocimiento del huevo (Cherian et al., 1996).

Marshall et al. (1994) notaron que en el huevo fresco de gallinas cuya dieta había sido suplementada con 1.5% de aceite de menhaden, presentaba mayor concentración de sustancias reactivas al ácido tiobarbiturico (TBARS) que en el huevo de gallinas sin suplementar. Aun cuando a la dieta con aceite de menhaden se le habían adicionado 12.5 mg de alfa-tocoferol/ave/d (la recomendación del NRC para una dieta convencional es de 0.5 mg/ave/d).

Aumentar la cantidad de VE, al parecer, tampoco es una solución, ya que se ha observado que adicionar concentraciones altas de VE (≥ 100 mg/kg), a dietas suplementadas con aceites de pescado o linaza, esta puede actuar como prooxidante mas que como antioxidante (Gebert et al. 1998; Leeson et al. 1998; Carrillo et al.2012). Chen et al. (1998) observaron que la VE actúa como prooxidante en la yema cuando su concentración en la dieta es superior a los 120 mg/kg. Franchini et al. (2002) señalan que altas concentraciones de VE (100-200 mg/kg) en la dieta aumenta la formación de MDA en el huevo. En tales casos, incorporar junto con la VE otros antioxidantes, tales como la vitamina C, sería útil para ayudar a la VE a recuperar su actividad antioxidante, ya que a diferencia de la VE, la vitamina C puede donar electrones y convertirse en ácido dehidroascorbico, especie no reactiva al oxígeno (Wong, 1989; Lee y Min, 2006).

Grune et al. (2001), sugieren utilizar concentraciones de VE menores a los 100 mg/kg. Ellos realizaron un ensayo en el que suplementaron con VE la dieta de las gallinas con diferentes concentraciones de aceite de pescado (0, 0.7, 1.4, 2.8, y 5.6%). Con 2.8% y 5.6% de aceite de pescado, la cantidad de AGn3 en la yema incrementó considerablemente. La dieta contenía solamente 11 UI de VE/kg, pero esta concentración resultó insuficiente para proteger a los AGPI de la peroxidación. Esto ocasionó un imbalance entre la vitamina E y los AGPI, originando la formación de productos de peroxidación lipídica como el MDA. En un segundo ensayo, las dietas fueron suplementadas con 1.5% de aceite de pescado y diferentes concentraciones de vitamina E (0, 5, 10, 20, 40, 80, 160 IU/kg). El huevo se almacenó durante varias semanas. Los resultados mostraron la necesidad de suplementar la dieta con al menos 80 UI de VE/kg para prevenir la formación de productos de la peroxidación lipídica durante el almacenamiento de huevos enriquecidos con AGn3.

Aun con todo ello, es posible que, tal como se mencionó antes, los antioxidantes propios en el ave (carotenoides, vitamina E, fosvitina, selenio, etc), presentes en el huevo (Guérin-Dubiard et al. 2007), contribuyan a proteger a estos AG por la importancia fisiológica que tienen para el ave; y que los compuestos oxidados detectados desde el primer día de almacenamiento en ambos tratamientos mediante la prueba de TBARS hayan sido otros, diferentes a los AG. Marshall et al. (1994) sugieren que los TBARS en yema pudieran ser el resultado de la transferencia directa de lípidos oxidados presentes en la dieta o producidos en el hígado y posteriormente transferidos a la yema junto con otros materiales lipofílicos.

La síntesis de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS) en el hígado de gallinas ponedoras ha sido confirmado por Caston et al. (1994) cuando comparó una dieta convencional como testigo contra otras que tenían 10 ó 20% de linaza molida. Encontraron un incremento de TBARS en el hígado, proporcional al nivel de inclusión de linaza en la dieta.

Aymond y Van Elswyk (1995) sugieren que las condiciones en las que se almacenan las dietas, tal como el uso de contenedores hermeticos mantenidos en refrigeración, pueden reducir una potencial deposición de TBARS en la yema.

Por otra parte, el hecho de que a los 60 días la concentración de MDA haya sido menor que al inicio y que a los 30 de almacenamiento no precisamente indica que haya habido menor oxidación, lo más probable es que se hayan formado otros compuestos productos de la oxidación, diferentes al MDA y que por lo tanto no pudieron ser medidos a través de la prueba de TBARS. Se sabe que durante la oxidación lipídica se generan los precursores del MDA (hidroxiperoxi epidioxidos, 1,3 dihidroxiperoxidos, 1,4 dihidroperoxido y los monohidroxiperoxidos) así como diversos compuestos que pueden reaccionar con el TBA por lo que los datos obtenidos con este método no son un reflejo exacto del grado de oxidación del sistema. Por lo tanto sería recomendable utilizar otras pruebas, además de la de TBARS, para conocer con mayor precisión el grado de oxidación en el huevo y poder identificar los compuestos que se oxidaron (Frankel y Neff, 1983; Guillen-Sanz y Guzmán-Chozas, 1998).

Utilizar el aceite de sardina con el fin de enriquecer al huevo con AGn3 es por el momento una alternativa no costosa, que debiera ser aprovechada en México por los avicultores (Gamez-Meza et al. 1999). Más aun cuando estudios realizados por Noriega-Rodríguez et al (2009) han demostrado que el AS refinado, blanqueado, deodorizado y no deodorizado conserva el alto contenido de estos ácidos grasos.

Es importante asegurarse de que el aceite de pescado sea de buena calidad y de que las dietas que se van a emplear, estén protegidas con antioxidantes, ya que una vez oxidado, ya sea el aceite como las dietas, la adición de antioxidantes no revertirá la situación (Surai y Spark, 2001).

Es necesario continuar realizando estudios que ayuden a determinar si es necesario adicionar VE a dietas suplementadas con aceites de pescado, y cual es la concentración más adecuada, para evitar se formen productos de oxidación. Así como para aclarar si son los ácidos grasos presentes en el aceite de pescado los compuestos que se están oxidando o son otros compuestos presentes en los aceites o en las dietas.

Conclusión

Se concluye que incluir hasta 2.5% de AS en la dieta aumenta significativamente el contenido de AGn3 en el huevo y reduce la relación n6:n3 en el mismo, lográndose

mantener estas características hasta por 60 días a temperatura ambiente, aun sin la adición de VE en la dieta. Adicionar 100 mg/kg de vitamina E a dietas suplementadas con 2.5% de AS no tuvo efecto alguno sobre la concentración de n3 en el huevo.

Referencias

- Ackman RG. 2005. Fish Oil. In: F.Sahidi (Ed) Bailey's industrial oil and fat products. 6th ed. Vol 3 pp. 279-317. Hoboken NJ: John Wiley & Sons Inc.
- Adams RL, Pratt DE, Lin JH, and Stadelman WJ. 1989. Introduction of omega-3 polyunsaturated fatty acids into eggs. *Poult. Sci.* 68 (Suppl 1): 166.
- Alvarez C, Cachaldora P, Méndez J, García-Rebollar P, De Blas JC. 2004. Effects of dietary conjugated linoleic acid and fish oil supplementation on performance and egg quality in laying hens. *Br Poult Sci.* 45, 524-529.
- Anzaldúa-Morales A. 1994. La Evaluación Sensorial de los Alimentos en la Teoría y en la Práctica. Editorial Acribia, Zaragoza, España.
- AOAC.2000. Official Methods of Analysis. 17th ed. Association Official of Analytical Chemists. AOAC International. Washington D.C. USA.
- Aymond WM, Van Elswyk ME. 1995. Yolk thiobarbituric acid reactive substances and n-3 fatty acids in response to whole and ground flaxseed. *Poult Sci.* 74:1388-1394.
- Bailey AE. 1984. Aceites y Grasas Industriales. Segunda edición. Editorial Reverte, 675pp.
- Bandarra N, Batista I, Nunes M, Empis J, and Christie W. 2007. Seasonal changes in lipid composition of Sardine (*Sardina pilchardus*). *J Food Sci* 62: 40-42.
- Belitz, HD, Grosch W. 1997. Química de los alimentos 2a ed. Ed. Acribia S.A. de C.V. Zaragoza España. pp.678-679.
- Bernal Gómez ME, De Mendonca-Junior CX, Mancini-Filho J. 2003. Estabilidad oxidativa de huevos enriquecidos con ácidos grasos poliinsaturados omega 3, frente a antioxidantes naturales. *Rev. Bras. Cienc.Farm.* 39 (4):
- Bimbo A. 1999. Pautas para la clasificación del aceite de pescado comestible. *Aceites y Grasas* 410-421.
- Botsoglou NA, Fletouris DJ, Papageorgiou GE, Vassilopoulos VN, Mantis AJ, Trakatellis AG. 1994. Rapid, sensitive, and specific thiobarbituric acid method for measuring lipid peroxidation in animal tissue, food, and feedstuff samples. *J Agric Food Chem* 42: 1931-1937.
- Bourre JM. 2005. Enrichissement de l'alimentation des animaux avec les acides gras w-3. Impact sur la valeur nutritionnelle de leurs produits pour l'homme. *Med Sci* 21:773-779.
- Burgess JR, Stevens L, Zhang W, Peck L. 2000. Long-chain polyunsaturated fatty acids in children with attention-deficit hyperactivity disorder. *Am J Clin Nutr* 71 (suppl):327s-330s.
- Cachaldora P, García-Rebollar P, Álvarez C, De Blas J, Méndez J. 2006. Effect of type and level of fish oil supplementation on yolk fat composition and n-3 fatty acids retention efficiency in laying hens. *Br Poult Sci* 47, 43-49.
- Cachaldora P, García-Rebollar P, Alvarez C, De Blas JC, Méndez J. 2007. Effect of type and level of basal fat and level of fish oil supplementation on yolk fat composition and n-3 fatty acids deposition efficiency in laying hens. *Anim Feed Sci Tech* 141, 104-114.
- Carrillo DS, Carranco JME, Castillo DRM, Castro GMI, Avila GE, Pérez-Gil RF. 2005. Cholesterol, n-3 and n-6 fatty acids content in eggs from laying hens fed with Red Crab Meal (*Pleuroncodes planipes*). *Poultry Sci.* 84: 167-172.
- Carrillo-Domínguez S, Avila GE, Vasquez PC, Fuente MB, Calvo CC, Carranco JME, Pérez-Gil RF. 2012. Effects of adding vitamin E to diets supplemented with sardine oil on the production of laying hens and fatty egg acid composition. *Afr J Food Sci* 6(1):12-19.
- Castillo-Badillo C, Vázquez-Valladolid J, González-Alcorta M, Morales-Barrera E, Castillo-Domínguez RM, Carrillo-Domínguez S. 2005. El aceite de atún como fuente de ácidos grasos w-3 en el huevo de gallina. *Grasas y Aceites* 56, 153-159.

- Caston L, Squires EJ. And Leeson S. 1994. Hen performance, egg quality and the sensory evaluation of eggs from SCWL hens fed dietary flax. *Can J Anim Sci* 74: 347-353.
- Cellamare M, Gómez GA. 2007. Alimentación de la sardina *Sardinella aurita* (Clupeidae) en el sureste de la Isla Margarita, Venezuela. *Bol. Inst.Oceanogr. Venezuela* 46: 23-26.
- Chen J, Latshaw I, Lee H, Min D .1998. Alpha-tocopherol content and oxidative stability of egg yolk as related to dietary alpha-tocopherol. *J Food Sci.* 63: 919-922.
- Cherian G. 2007. Omega-3 Fatty Acids. In: *Wild-Type Food in Health Promotion and Disease Prevention*. F.De Meester and R.R. Watson (Editors), pp. 169-176. Humana Press Inc. Totowa, NJ, USA.
- Cherian G. 2008. Egg quality and yolk polyunsaturated fatty acid status in relation to broiler breeder hen age and dietary n-3 oils. *Poult Sci* 87, 1131-1137.
- Cherian G, Wolfe FW, Sim J. 1996. Dietary oils with added tocopherols: effects on egg or tissue tocopherols, fatty acids, and oxidative stability. *Poult. Sci.* 75: 423-431.
- Cherian G, Traber MG, Goeger MP, Leonard SW. 2007. Conjugated linoleic acid and fish oil in laying hen diets: effects on egg fatty acids, thiobarbituric acid reactive substances, and tocopherols during storage. *Poult Sci* 86:953-958.
- Chow KC .2008. *Fatty Acids in Foods and their Health Implications*. 3th ed. CRC Press, Boca Raton, Fla, USA. pp.1257.
- Chung HY, Rasmussen HM, Johnson EJ. 2004. Lutein bioavailability is higher from Lutein-enriched eggs than from supplements and spinach in men. *J Nutr* 134:1887-1893.
- Clydesdale EM. 1998. Color: origin, stability, measurement, and quality. In: *Food Storage Stability*. Irwin A. Taub and R. Paul Singh (eds). pp. 175-190. CRC Press, Boca Raton, Fla, USA.
- Cloughley J, Noble R, Speake B. and Sparks N. 1997. Manipulation of docosahexaenoic (C22:6 n3) acid in the chicken's egg. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids* 57:222.
- Cornejo S, Hidalgo H, Araya J, Pokniak J. 2008. Suplementación de dietas de gallinas de postura comercial con aceites de pescado de diferentes grados de refinación. Efectos productivos en las aves y en la calidad organoléptica de los huevos. *Arch Med Vet* 40, 45-50.
- Eskin NAM, Robinson DS. 2001. *Food Shelf Life Stability. Chemical, Biochemical, and Microbiological changes*. CRC Press, Boca Raton, Florida, USA, 370 pp.
- Eskin NAM, Przybylski R. 2001. Antioxidant and shelf life of foods. In: *Food Shelf Life Stability, Chemical, Biochemical, and Microbiological Changes*. NAM Eskin and DS Robinson (editors), pp.175-209.
- Farrel D. 1998. Enrichment of hen eggs with n-3 long-chain fatty acids and evaluation of enriched eggs in humans. *Am J Clin Nutr.* 68:538-544.
- Franchini A, Sirri F, Tallarico N, Minelli G, Iaffaldano N, Meluzzi A. 2002. Oxidative stability and sensory and functional properties of eggs from laying hens fed supranutritional doses of vitamin E and C. *Poult. Sci.* 81: 1744-1750.
- Frankel EN and Neff WE. 1983. Formation of malonaldehyde from lipid oxidation products. *Biochem. Biophys. Acta.* 754:264-270.
- Galobart J, Barroeta AC, Baucells MD, Guardiola F. 2001. Lipid oxidation in fresh and spray-dried eggs enriched with omega3 and omega 6 polyunsaturated fatty acids during storage as affected by dietary vitamin E and canthaxanthin supplementation. *Poult Sci.* 80:327-337.
- Gamez-Meza N, Higuera-Ciajara I, Calderón de la Barca AM, Vazquez-Moreno L, Noriega-Rodríguez, Angulo-Guerrero O. 1999. Seasonal variation in the fatty acid composition and quality of sardine oil from *Sardinops sagax caerulea* of the Gulf of California. *Lipids* 34:639-642.
- García C, Albala C. 1998. Composición lipídica de huevos de gallinas alimentadas con productos grasos y proteicos marinos. *Arch.Lat.Nutr.* 48:71-76.
- García-Rebollar P, Cachaldora P, Alvarez C, De Blas C. and Méndez J. 2008. Effect of the combined supplementation of diets with increasing levels of fish and linseed oils on yolk fat composition and sensorial quality of eggs in laying hens. *Anim. Feed Sci. Tech.* 140:337-348.
- Gebauer SK, Psota TL, Harris WS, Kris-Etherton PM. 2006. N-3 Fatty acid dietary recommendations and food sources to achieve essentiality and cardiovascular benefits. *Am J Clin Nutr* 83 (suppl):1526S-35S.

- Gebert S, Messikommer R, Pfirter HP, Bee G, Wenk C. 1998. Dietary fats and vitamin E in diets for laying hens: effects on laying performance, storage stability and fatty acid composition of eggs. *Archiv Geflück* 62:214-222.
- Goodrow EF, Wilson TA, Houde SC, Vishwanathan R, Scollin PA, Handelman G, Nicolosi RJ. 2006. Consumption of one egg per day increases serum lutein and zeaxanthin concentrations in older adults without altering serum lipid and lipoprotein cholesterol concentrations. *J. Nutr.* 136:2519-2524.
- González-Esquerra R, Leeson S. 2000. Effect of feeding hens regular or deodorized menhaden oil on production parameters, yolk fatty acid profile, and sensory evaluation of eggs. *Poult. Sci.* 79: 1597-1602.
- González-Esquerra R, Leeson S. 2001. Alternatives for enrichment of eggs and chicken meat with omega-3 fatty acids. *Can. J. Anim. Sci.* 81: 295-305.
- González-Muñoz M, Bastida S, Jiménez O, Lorenzo de C, Vergara G, Sánchez-Muñoz F. 2009. The effect of dietary fat on the fatty acid composition and cholesterol content of the eggs from Hy-line and Warren hens. *Grasas y Aceites* 60, 350-359.
- Goodfellow J. 2000. Dietary Supplementation in Subjects with Hypercholesterolemia. *J. Am. Collect. Cardiology.* 35:265-270.
- Grobas S, Mendez J, Lázaro R, de Blas C. And Mateos GG. 2001. Influence of source and percentage of fat added to diet on performance and fatty acid composition of egg yolks of two strains of laying hens. *Poult. Sci.* 80:1171-1179.
- Grune T, Krämer K, Hoppe PP, Siems W. 2001. Enrichment of eggs with n-3 polyunsaturated fatty acids: Effects of vitamin E supplementation. *Lipids* 36(8): 833-838.
- Guérin-Dubiard C, Castellani O, Anton M. 2007. Egg compounds with antioxidant and mineral binding properties. In: Huopalahati R, López-Fandiño R, Anton M, Schade R (eds.), *Bioactive Egg Compound*, Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, 223-228.
- Guillén-Sans R, Guzmán-Chozas M. 1998. The thiobarbituric acid (TBA) reaction in foods: A Review. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, 38(4):315-350 (1998).
- Hargis PS, Van Elswyk ME, Hargis BM. 1991. Dietary modification of yolk lipid with menhaden oil. *Poult. Sci.* 70:874-883.
- Hargis P.S., Van Elswyk M.E. 1993. Manipulating the fatty acid composition of poultry meat and eggs for the health conscious consumer. *World's Poultry Sci. J.* 49:251-264.
- Hayat Z, Cherian G, Pasha TN, Khattak FM, Jabbar MA. 2010. Oxidative stability and lipid components of eggs from flax-fed hens: effect of dietary antioxidants and storage. *Poult. Sci.* 89: 1285-1292.
- Helland IB, Smith L, Saarem K, Saugstad OD, Drevon CA. (2003). Maternal supplementation with very-long-chain n3 fatty acids during pregnancy and lactation augments children's IQ at 4 years of age. *Pediatrics* 111:39-44.
- Herber-McNeill, Van Elswyk ME. 1996. Dietary marine algae promotes efficient deposition of n-3 fatty acids for the production of enriched shell eggs. *Poultry Science* 75: 1501-1507.
- Hertelendy F, Biellier HV. 1978. Prostaglandin levels in avian blood and reproductive organs. *Biol. Reprod.* 18: 204-211.
- Holub B. 2002. Clinical nutrition: 4. Omega-3 fatty acids in cardiovascular care. *JAMC* 166, 608-615.
- Howe PRC, Downing A, Grenyer BFS, Grigonis-Deane EM, Bryden WL. 2002. Tuna Fishmeal as a Source of DHA for n-3 PUFA enrichment of Pork, Chicken, and Eggs. *Lipids*, 37 (11):1067-1076.
- Huang Z, Leibovitz H, Lee C, Miller R. 1990. Effect of dietary fish oil on w-3 fatty acid levels and general performance of commercial broilers fed practical levels of redfish meal. *Poult. Sci.* 68: 153-162.
- Hudelson KS, Hudelson P. 1996. A brief review of the female avian reproductive cycle with special emphasis on the role of prostaglandins and clinical applications. *J. Avian Med. Surgery* 10:67-74.
- Huerta-Jiménez M, Ortega-CerrillaME, Cobos-Peralta M, Herrera-Haro JG, Díaz-Cruz A, Guinzberg-Perrusquia R. 2005. Estrés oxidativo y el uso de antioxidantes en animales domésticos. *Interciencia* 30 (12): 728-734.
- Kim JH, J Hwangbo, NJ Choi, HG Park, DH Yoon, EW Park, SH Lee, Bk Park, YJ Kim. 2007. Effect of dietary supplementation with conjugated linoleic acid, with oleic, linoleic, or linolenic acid, on egg quality characteristics and fat accumulation in the egg yolk. *Poult. Sci.* 86, 1180-1186.

- Kirunda DFK., S.E.Scheideler, and S.R.McKee. 2001. The Efficacy of Vitamin E (DL- α -tocopheryl acetate) Supplementation in Hen Diets to Alleviate Egg Quality Deterioration Associated with High Temperature Exposure. *Poult.Sci.* 80:1378-1383.
- Kouba M, Mourot J. 2011. A review of nutritional effects on fat composition of animal products with special emphasis on n-3 polyunsaturated fatty acids. *Biochim* 93: 13-17.
- Kralik G, Z Gajcevic, Z Skrtic. 2008. The effect of different oil supplementations on laying performance and fatty acid composition of egg yolk. *Ital J Anim Sci* 7, 173-183.
- Kris-Etherton PM, Harris WS, Appel LJ. 2002. Fish consumption, fish oil, omega-3 fatty acids, and cardiovascular disease. *Circulation* 106:2747-2757.
- Lee JY. and Hwang DH. 2008. Dietary fatty acids and eicosanoids. In: *Fatty Acids in Foods and their Health Implications*. Ching Kuang Chow (editor). Pp.713-726. Third edition. CRC Press, Boca Raton, Fla, USA.
- Leeson, S., L. Caston, and T. Maclaurin. 1998. Organoleptic evaluation of eggs produced by laying hens fed diets containing graded levels of flaxseed and vitamin E. *Poult. Sci.* 77:1436-1440.
- Lewis NM, Seburg S, Flanagan NL. 2000. Enriched eggs as a source of n-3 polyunsaturated fatty acids for humans. *Poult Sci.* 79:971-974.
- Li J, Min D. 2006. Nutraceuticals aging and food oxidation. In: Akoh C (ed.), *Handbook of Functional Lipids* Boca Raton, USA: CRC Press, 325-350.
- Lin JH, Pratt DE, Adams RL and WJ Stadelman. 1995. Influence of dietary menhaden fish oil on fatty acid composition of the egg. *J Food Qual* 18:149-165.
- Marshall AC, Sams AR, Van Elswyk ME. 1994. Oxidation stability and sensory quality of stored eggs from hens fed 1.5% menhaden oil. *J. Food Sci.* 59: 561-563.
- Maurice DV. 1994. Dietary fish oils. Feeding to produce designer eggs. *Feed Management* 45: 29-32.
- Meilgaard M. Civille GV, Carr BT. 1999. *Sensory Evaluation Techniques*. CRC Press. Boca Ratón, Florida, USA. 387 pp.
- Meluzzi A, Sirri F, Manfreda G, Tallarico N. and Franchini A. 2000. Effects of dietary vitamin E on the quality of table eggs enriched with n3 long chain fatty acids. *Poult. Sci.* 79:539-545.
- Millan NR, Millan NE, Álvarez BS, Trees CC, Santamaría del Angek E. 1994. Variabilidad de la comunidad del fitoplanctonedn Bahía San Quintín estimada mediante el análisis de pigmentos. *Cienc. Mar.* 30:145-153.
- Mohiti-Asli M, Shariatmadari F, Lotfollahian H, Taghi Mazuji M. 2008 . Effects of supplementing layer hen diets with selenium and vitamin E on egg quality, lipid oxidation and fatty acid composition during storage. *Can J Anim Sci.*88:475-483.
- Noriega-Rodríguez JA, Ortega-García J, Angulo-Guerrero O, García HS, Medina-Júarez LA and Gamez-Meza N. 2009. Oil production from Sardine (*Sardinops sagax caerulea*). Obtención de aceite de sardina (*Sardinops sagax caerulea*). *CyTA-Journal of Food* 7 (3): 173-179.
- NRC. 1994. *Nutrient Requirement of Poultry*. National Research Council, 9th rev ed. Academy Press, Washington DC. USA.
- Oku T, Kato H, Kunishige-Taguchi T, Hattori M, Wada K, Hayashi M. 1996. Stability of fat soluble components such as n-3 polyunsaturated fatty acids and physiochemical properties in EPA and DHA enriched egg. *Jap J Nutr* 54:109-119.
- Pike O, Peng I. 1985. Stability of shell egg and liquid yolk to lipid oxidation. *Poult. Sci.* 64: 1470-1475.
- Qi GH, Sim JS. 1998. Natural tocopherol enrichment and its effect in n-3 fatty acid modified chicken eggs. *J.Agric. Food Chem.* 46: 1920-1926.
- Rice R. 1999. Fish Nutritional value. In: *Encyclopedia of Human Nutrition*. MJ Sadler, JJ Strain, B Caballero (eds). Volume II. Pp. 793-803 pp. Academic Press.
- Salih AM, Smith DM, Price JF, Dawson LE. 1987. Modified extraction 2 thiobarbituric acid method for measuring lipid oxidation in poultry. *Poult Sci* 66:1483-1488.
- SAS. 2008. *Statistical Analysis System/STAT. User's Guide*. SAS Institute Inc., Cary, NC. USA.
- Seuss-Baum I. 2007. Nutritional evaluation og egg compounds. In: *Bioactive Egg Compounds*. Rainer Huopalahti, Rosina López-Fandiño, Marc Anton and Rüdiger Schade (editors), pp.117-140. Springer-Verlag Berlin Helderberg.
- Simopoulos AP. 2006. Evolutionary aspects of diet, the omega-6/omega-3 ratio and genetic variation: nutritional implications for chronic diseases. *Biomed Pharmacother* 60:502-507.

- Simopoulos AP. 2008. The importance of the omega-6/omega-3 fatty acid ratio in cardiovascular disease and other chronic diseases. *Exp Biol Med* 233:674-688.
- Sprecher H, Luthria DL, Mohamed B. And Baykousheva SP. 1995. Reevaluation of the pathways for the biosynthesis of polyunsaturated fatty acids. *J Lipid Res* 36:2471-2477.
- Stak, KD. 2000. Effects of fish-oil concentrate in postmenopausal women receiving and not receiving hormone replacement therapy in placebo-controlled, double-blind trial". *Am. J. Clin. Nutr.* 72: 389-394.
- Surai P. 2003. Natural antioxidants in avian nutrition and reproduction. Nottingham University Press, England, UK.
- Surai P, Sparks N. 2000. Tissue-Specific and alpha-tocopherol profiles in male chickens depending on dietary tuna oil and vitamin E provision. *Poult. Sci.* 79: 1132-1142.
- Surai PF and Sparks NHC. 2001. Designer eggs: from improvement of egg composition to functional food. *Trends in Food Sci. & Tech.* 12:7-16.
- Surai PF, Papazyan TT, Sparks N, Speake BK. 2007. Simultaneous Enrichment of Eggs With PUFAs and Antioxidants. In: *Wild-Type Food in Health Promotion and Disease Prevention*, Ed. De Meester F, Watson RR, , Humana Press Inc., Totowa, NJ, USA. pp 139-154.
- Torre-Marina MC, Fonseca-Pereda M, Quintana-López JA. 2012. El Huevo: Mitos, Realidades y beneficios. Instituto Nacional Avícola, ESDAI, Editorial Trillas, México DF. 144 pp.
- Van Elswyk ME 1997a. Comparison of n-3 fatty acid sources in laying hen rations for improvement of whole egg nutritional quality: a review. *Brit.J Nutr.* 78, Suppl. 1, S61-S69.
- Van Elswyk ME, Sams AR and Hargis PS. 1992. Composition, functionality, and sensory evaluation of eggs from hens fed dietary menhaden oil. *J. Food Sci.* 57:342-349.
- Van Elswyk M, Dawson P, Sams A. 1995. Dietary menhaden oil influences sensory characteristics and headspace volatiles of shell eggs. *J. Food Sci.* 60: 85-89.
- Watkins B, R Elkin. 1992. Dietary modulation of oleic and stearic acids in egg yolks. *J Food Comp Anal* 5, 209-215.
- Wong, DWS. 1989. Química de los alimentos. Ed. Acribia, Zaragoza España. Pp. 2-12, 405-407, 415-419. (1989).
- Yalcyn H, Unal MK, Basmacyoolu H. 2007. The fatty acid and cholesterol composition of enriched egg yolk lipids obtained by modifying hens diets with fish oil and flaxseed. *Grasas y Aceites* 58: 372-378.
- Yannakopoulos A. 2007. Egg enrichment in omega-3 fatty acids. In: *Bioactive Egg Compounds*. Rainer H, R López-Fandiño, M Anton, R Schade (eds). Springer-Verlag Berlin Heidelberg, Pp 159-170.
- Yu MM and Sim JS. 1987. Biological incorporation of n3 polyunsaturated fatty acids into chicken eggs. *Poult Sci* 66: (Suppl. 1): 95 (Abstr).

6.3 Efecto sobre la composición en ácidos grasos, características sensoriales y estabilidad oxidativa del huevo al suplementar la dieta para gallinas ponedoras con **aceite de sardina y algas marinas**

Efecto sobre la composición en ácidos grasos, características sensoriales y estabilidad oxidativa del huevo al suplementar la dieta para gallinas ponedoras con aceite de sardina y algas marinas

Resumen

El objetivo de este estudio fue saber como se ve afectada la composición en ácidos grasos, características sensoriales y estabilidad oxidativa del huevo, cuando se agregan 4% u 8% de las algas marinas *Sargassum* spp. a dietas suplementadas con 2.5% de aceite de sardina, manteniendo el huevo almacenado por un periodo de 60 días a temperatura ambiente. Para ello se utilizaron 240 gallinas Bovans White de 75 semanas de edad, distribuidas en cuatro tratamientos con 5 réplicas de 12 aves cada una, constituyendo cada réplica la unidad experimental. A cada grupo de 60 gallinas le fue asignada aleatoriamente una de las siguientes dietas: T1-dieta base (DB), T2-DB+2.5%AS, T3-DB+2.5%AS+4%AM, T4-DB+2.5%AS+8%AM. El ensayo tuvo una duración de 4 semanas, con una semana previa de acostumbramiento. Agua y alimento fueron suministrados *ad libitum*. Se llevó registro de las variables productivas y al final se midió el color de la yema y se evaluó sensorialmente el sabor del huevo. La concentración de ácidos grasos (AG) en el huevo y el grado de oxidación de los mismos se midió a los 0, 30 y 60 días de almacenamiento a temperatura ambiente (20 C), mediante la prueba de TBARS. Los resultados mostraron que adicionar 4% AM a dietas suplementadas con AS reduce el consumo de alimento, la producción, peso y masa del mismo ($P<0.05$); el color de la yema fue similar al tratamiento con solo AS ($P>0.05$). Con 8% de AM no se observaron dichos cambios, excepto que el peso fue menor y el color de la yema mas intenso ($P<0.05$). El contenido de lípidos totales en las dietas T1 y T2 no fue afectado por el tiempo ni por la suplementación con AS ($P>0.05$); sin embargo, en T3 y T4 el contenido de LT se redujo 11% y 17%, respectivamente. El total de AGS aumentó en la dieta con AS ($P<0.05$), pero al adicionar AM a estas dietas la concentración en el huevo aumentó aun mas en el día 0 ($P<0.05$), pero conforme avanzó el tiempo de conservación del huevo, los valores disminuyeron significativamente ($P<0.05$). El total de AGM aumentó en los tratamientos que tenían AS, en T2 se mantuvo constante durante los 60 días, pero en T3 y T4 disminuyó conforme pasó el tiempo, principalmente el ácido oleico ($P<0.05$). El total de AGPI en el huevo se redujo ($P<0.05$) en los tratamientos con AS ($P<0.05$). En T2, la concentración de los AGPI se mantuvo constante a lo largo de los 60 días ($P>0.05$); mientras que en aquellos que además tenían AM (T3 y T4) se observaron valores mas altos en el día 60 ($P<0.05$). Incluir AM en la dieta suplementada con AS incremento aún mas la concentración de AGn3 en el huevo, particularmente de DHA ($P<0.05$), observándose los valores mas altos en T4 ($P<0.05$). La relación n6:n3 en el T1 fue de 11:1, mientras que en los demás fue de 2:1 y en general no se modificó a lo largo de los 60 días ($P>0.05$). Desde el primer día de conservación, hubo formación de MDA en las yemas de todos los tratamientos ($P>0.05$); pero esto fue mas evidente en T4 ($P>0.05$). A los 30 días, aumentó la formación de MDA en todos los tratamientos, particularmente en aquellos que incluían AS ($P>0.05$). A los 60 días, contrario a lo esperado, los valores de MDA en todos los tratamientos fueron menores

a los del día 30 ($P > 0.05$). Se concluye que agregar 4% y 8% de las algas *Sargassum* spp a dietas suplementadas con AS incrementa la concentración de AGn3 en el huevo, principalmente DHA, ayudando a mantener estos valores durante los 60 d que se conservó el huevo a temperatura ambiente.

Palabras clave: aceite de sardina, algas marinas, ácidos grasos omega 3, estabilidad oxidativa, huevo

Introducción

En virtud de los múltiples beneficios que los ácidos grasos omega 3 (AGn3) aportan a la salud, existe hoy un gran interés en hacer llegar a los consumidores este tipo de compuestos bioactivos (Burgess et al. 2000; Stak, 2000; Goodfellow, 2000; Kris-Etherton et al. 2002; Helland et al. 2003; Chow, 2008; Simopoulos, 2008). El huevo ha resultado ser un excelente vehículo para lograr este objetivo, ya que es uno de los alimentos de mayor consumo por su excelente valor nutritivo, por su precio que lo hace asequible a toda la población, por su versatilidad para ser preparado en muy diferentes formas, y por muchas otras razones mas (Farrel, 1998; Surai y Spark, 2001; Lewis et al. 2000; Torre-Marina et al. 2012).

Con la finalidad de producir huevos con un alto contenido de AGn3, diversos ingredientes han sido utilizados en la dieta de las gallinas (García y Albalá, 1998; González-Esquerri y Leeson, 2000, 2001; Bourre, 2005; Carrillo et al. 2005; Yalcyn et al. 2007; Yannakopoulos, 2007; Kralik et al. 2008; Kouba y Mourot, 2011). En particular, los aceites de pescado han sido de gran interés por su alto contenido de los ácidos eicosapentaenoico (EPA) y docosahexaenoico (DHA) (Hargis y Van Elswyk, 1993; Castillo-Badillo et al. 2005; Cachaldora et al. 2006; Cornejo et al. 2008).

Sin embargo, esta misma característica hace a los aceites de pescado altamente susceptibles a la oxidación lipídica, una de las principales vías de deterioro de los alimentos que, por lo general, deriva en una pérdida de la calidad comercial, organoléptica y sanitaria del alimento (Bailey, 1984; Eskin y Robinson, 2001).

En vista de ello, se ha considerado apropiado agregar antioxidante a las dietas suplementadas con aceites de pescado (AP) a fin de reducir el riesgo de una

lipoperoxidación y en consecuencia la pérdida o descomposición de los ácidos grasos, particularmente los de cadena larga. El antioxidante más comúnmente utilizado ha sido la vitamina E (VE) (Chen et al. 1998; Grune et al. 2001; Huerta et al. 2005; Surai et al. 2007). Sin embargo, los resultados aun son contradictorios, algunos autores como Grune et al. 2001 han encontrado efectos beneficiosos utilizando concentraciones menores a los 80 mg/kg, otros como Melluzzi et al. (2000) no encontraron efecto alguno sobre la composición de AG en el huevo cuando agregaron 50 y 100 mg/kg de vitamina E a dietas suplementadas con 3% de AP. Otros más hallaron que, adicionar cantidades altas de vitamina E (200-400 mg/kg) a dietas suplementadas con aceite de pescado no solo reduce la concentración de AGn3 en el huevo, sino también puede funcionar como prooxidante (Cherian et al. 1996; Chen et al. 1998; Franchini et al. 2002; Carrillo et al. 2012).

Otras alternativas para mantener la estabilidad oxidativa de huevos enriquecidos con ácidos grasos omega 3 (AGn3) ya han sido estudiadas (Bou et al. 2009). Sin embargo, existe un recurso más que también puede ser de gran utilidad por la gran cantidad de compuestos antioxidantes que de manera natural poseen estas son, las algas marinas. Estos organismos fotosintéticos están expuestos a la luz solar y a altas concentraciones de oxígeno, lo que da lugar a la formación de radicales libres y a otros agentes oxidantes. Sin embargo, la ausencia de daños en los ácidos grasos poliinsaturados (importantes componentes estructurales de los tilacoides, especialmente vulnerables a la fotooxidación) de las algas demuestra que las células de estos organismos marinos tienen mecanismos y compuestos que previenen y los protegen de la oxidación (Ramarathanam et al. 1995; Matsukawa et al. 1997; Freile, 2001; Allen et al. 2001; Yuan, 2008; El Gamal-2010). Estos compuestos antioxidantes presentes en las algas marinas son de naturaleza muy variada e incluyen compuestos fenólicos, vitamina C, vitamina E, carotenoides, clorofila y sus derivados (feofitinas), así como fosfolípidos (fosfatidiletanolamina, colina y serina) que presentan un efecto antioxidante sinérgico con la vitamina E (Matanjun et al. 2008; Qasim y Barkati, 1985; Nakamura et al. 1994; Yan et al. 1999; Yuan, 2008; Freile, 2001;

Su uso en la alimentación de las aves ya ha sido estudiado, sugiriéndose su inclusión en la dieta en niveles menores al 10% de la ración ya que por su elevado contenido en sales, niveles superiores producen heces muy líquidas (Rojkind, 1977; Carrillo en prensa).

Trabajos realizados por Carrillo et al. (2008, 2012) mostraron que incorporar 10% de algas marinas a dietas suplementadas con 2% de aceite de sardina incrementa aun mas la concentración de AGn3 en el huevo, así como la coloración de la yema. Sin embargo, su efecto antioxidante sobre huevos enriquecidos con AGn3 cuando la dieta es suplementada con en antidades mayores de aceite de pescado y menor nivel de inclusión de algas en la dieta no ha sido evaluado.

Por lo tanto, el objetivo de este estudio fue saber como se ve afectada la composición en ácidos grasos, características sensoriales y estabilidad oxidativa del huevo, al agregar 4% y 8% de las algas marinas *Sargassum* spp. a dietas suplementadas con 2.5% de aceite de sardina, manteniendo el huevo almacenado por un periodo de 60 días a temperatura ambiente.

Materiales y Métodos

Obtención del aceite de pescado y de las algas marinas

El aceite de sardina (AS) empleado en el estudio se obtuvo en una planta procesadora de harinas de pescado en Guaymas, Sonora, México. Estaba estabilizado con 200 ppm de butilhidroxitolueno (BHT), pero no estaba deodorizado, refinado ni blanqueado. Se mantuvo en refrigeración y en oscuridad hasta el momento de ser utilizado. Las algas marinas (AM) *Sargassum* spp. fueron recolectadas en forma manual en las costas de la Bahía de la Paz, Baja California Sur, México. Se extendieron sobre una plancha de cemento y se dejaron secar al sol durante un periodo de tres días, después se molieron en un molino de martillos.

Formulación y preparación de las dietas

Las dietas se formularon con el programa Nutrion Windows TM (Versión 5.0 Pro), cubriendo las necesidades nutrimentales establecidas por el National Research Council (NRC 1994) para gallinas ponedoras, con 15% de proteína cruda y 2785 kcal de energía metabolizable. Fueron elaboradas con base sorgo-soya y sin antioxidante. La dieta base (DB) fungió como testigo (T1), la dieta del tratamiento 2 (T2) estaba suplementada con

Cuadro 14. Composición porcentual de las dietas experimentales

	T1	T2	T3	T4
Sorgo grano	61.80	61.80	59.48	55.40
Pasta de soya	20.40	20.40	20.95	21.93
Alga <i>Sargassum</i> spp.	0.00	0.00	4.00	8.00
Carbonato de calcio	12.40	12.40	10.87	9.60
Aceite de soya	2.50	0.00	0.00	0.55
Aceite de sardina	0.00	2.50	2.50	2.50
Ortofosfato 1820 1	1.55	1.55	1.55	1.55
Sal (NaCl)	0.45	0.45	0.00	0.00
L-Lisina HCL	0.35	0.35	0.18	0.00
Avelut polvo 15 2	0.10	0.10	0.10	0.10
Toxisorb	0.10	0.10	0.10	0.10
Alimet 88%	0.08	0.08	0.00	0.00
Avired 3	0.08	0.08	0.08	0.08
Premezcla mineral 4	0.05	0.05	0.05	0.05
Cloruro de colina 60	0.05	0.05	0.05	0.05
Premezcla vitamínica 5	0.05	0.05	0.05	0.05
Bacitracina	0.03	0.03	0.03	0.03
L-Treonina	0.03	0.03	0.00	0.00
Total	100.00	100.00	99.98	99.98
Aporte calculado				
Energía metabolizable (Mcal/kg)	2.75	2.75	2.75	2.75
Proteína cruda (%)	15.32	15.32	15.64	16.00
Metionina (%)	0.33	0.33	0.30	0.35
Metionina+Cistina (%)	0.58	0.58	0.60	0.69
Lisina (%)	1.02	1.02	1.02	1.04
Treonina (%)	0.63	0.63	0.73	0.85
Calcio total (%)	4.85	4.85	4.43	4.10
Fósforo disponible (%)	0.41	0.41	0.41	0.41
Sodio (%)	0.18	0.18	0.81	1.62
Cloro (%)	0.40	0.40	0.44	0.75
Colina (mg/kg)	1260.69	1260.69	1260.69	1260.69

T1-Dieta base (DB), T2-DB+2.5%AS, T3-DB+2.5%AS+4%AM, T4-DB+2.5%AS+8%AM

¹ Fosfato monobásico: P 21% min, Ca 18% min, F 0.21% max, humedad 5% max.

² Fuente natural de xantofilas amarillas (flor de cempasuchitl), 15 g/kg

³ Pigmento vegetal rojo (Lucantin Red) como fuente de cantaxantina, 5 g total carotenoides/kg

⁴ Minerales (mg/kg): Mn 120; Zn 100; Fe 120; Cu 12; I 0.7; Se 0.4; Co 0.2; excipiente, cbp 1 000

⁵ Vitaminas (per kg): A, 10 000 000 IU; D₃, 3 000 000 IU; E, 20 000 IU; K₃, 2.500 g; Tiamina, 2.500 g;

Riboflavina, 5 g; Niacin, 35 g; Pantotenic acid, 10 g; Pyridoxine, 4 g; Folic acid, 1 g; Cyanocobalamin,

10 mg; Biotin, 200 mg; excipiente cbp 1000

2.5%AS, la del tratamiento 3 (T3) con 2.5% AS+4% del alga marina (AM) y por último la del tratamiento 4 (T4) con 2.5%AS+8%AM (Cuadro 14).

Las dietas se prepararon cada semana, primero en una mezcladora de gusano sinfín con capacidad para 120 kg/5 minutos, y posteriormente en una mezcladora de listón (Howes Co Inc model 152 M) por 3 minutos a 75 rpm.

Análisis de la composición de ácidos grasos de los aceites, algas y dietas

En el caso de los aceites, algas y dietas, previo al análisis de ácidos grasos, se hizo una extracción de lípidos con cloroformo:etanol (1:1) (AOAC 2000, método 923.07). El extracto lipídico fue metilado con trifluoruro de boro al 20% en una solución metanólica al 2% (AOAC 2000, método 969.33). Las muestras se inyectaron en un cromatógrafo de gases Varian, modelo 3380 CX equipado con un automuestreador CP8400, detector de ionización de flama y columna DB23 de 30 m con un d.i. de 0.25mm. Se utilizó al nitrógeno como gas acarreador a un flujo de 30 mL/min. Las temperaturas utilizadas fueron: columna 230°C, inyector 150°C, detector 300°C. Para calcular la concentración de ácidos grasos se utilizó como patrón de referencia una mezcla de estándares de ácidos grasos con concentraciones conocidas (SupelcoTM 37 FAME Mix SIGMA). El ácido miristoleico fue utilizado como estándar interno. La integración de los resultados se hizo mediante el programa Star Chromatography Workstation vs 6.3 Varian Associates, Inc. Los resultados se reportan en porcentaje del total de ácidos grasos (%TAG) (Cuadros 15 y 16).

Medición de las variables productivas

El ensayo experimental con las aves tuvo lugar en el Centro Experimental de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia (UNAM), ubicado en Santiago, Zapotitlán, Delegación Tlahuac, Distrito Federal. El clima de la región es templado subhúmedo, con una precipitación anual de 747 mm, siendo enero el mes mas frío y mayo el más caluroso. Para cada tratamiento se utilizaron 60 gallinas Bovans White de 75 semanas de edad, con 5 réplicas de 12 aves cada una, constituyendo cada réplica la unidad experimental. A cada grupo de gallinas le fue asignada aleatoriamente una de las dietas experimentales. El ensayo tuvo una duración de 4 semanas, con una semana previa de acostumbramiento y un programa

Cuadro 15. Composición en ácidos grasos de los aceites y algas *Sargassum* spp.

Acido graso (% TAG)	Aceite de Soya	Aceite de sardina	Alga marina
Mirístico (C14:0)	0.11	6.09	7.04
Palmítico (C16:0)	10.77	18.54	35.47
Heptadecanoico (C17:0)	0.10	0.56	0.21
Esteárico (C18:0)	4.22	3.82	2.39
Araquídico (C20:0)	0.31	0.29	1.13
Behénico (C22:0)	0.07	0.12	0.75
Total AGS	15.58	29.42	46.99
Pentadecanoico (C15:1)	0.00	0.51	0.45
Palmitelaídico (C16:1)	0.00	0.13	0.00
Palmitoleico (C16:1)	0.18	7.47	3.21
cis10-heptadecenoico (C17:1)	0.07	0.99	0.28
Elaídico (C18:1)	0.07	0.11	0.15
Oleico (C18:1)	21.91	12.20	9.22
cis-vaccénico (C18:1)	0.83	3.06	0.00
Eicosenoico (C20:1)	0.22	0.22	0.14
Eruídico (C22:1)	0.05	0.22	0.23
Total AGM	23.33	24.91	13.68
Linolelaídico (C18:2)	0.04	0.00	0.5
Linoleico (C18:2 n6)	53.23	1.37	6.74
CLA c9,t11 y c11,t9 (C18:2)	0.03	2.55	0.00
CLA t10,c12 (C18:2)	0.00	0.29	0.00
γ-linolénico (C18:3 n6)	0.06	0.31	0.16
α-linolénico (C18:3 n3)	6.95	0.99	1.67
cis-11,14-eicosadienoico (C20:2)	0.05	0.25	0.16
cis-11,14,17eicosatrienoico (C20:3)	0.10	0.18	0.32
cis-8,11,14-eicatrienoico (C20:3)	0.00	0.22	0.28
Araquidónico (C20:4 n6)	0.00	0.75	2.99
Eicosapentaenoico (C20:5 n3)	0.40	14.20	0.81
Docosapentaenoico (C22:5 n3)	0.00	1.57	10.09
Docosahexaenoico (C22:6 n3)	0.04	10.26	14.97
TOTAL AGPI	60.9	32.94	38.69
Total n6	53.29	2.43	9.89
Total n3	7.39	27.02	27.54

El total de estos valores no da 100% porque ácidos grasos menores no están reportados.

TAG– Total de ácidos grasos AGS – Ácidos grasos saturados, AGM- Ácidos grasos monoinsaturados, AGPI- Ácidos grasos poliinsaturados

Cuadro 16. Composición en ácidos grasos de las dietas experimentales

Acido graso (% Total de ácidos grasos)	T1	T2	T3	T4
Mirístico (C14:0)	0.24	3.46	3.65	3.87
Palmitico (C16:0)	13.03	17.01	17.94	17.62
Heptadecanoico (C17:0)	0.12	0.35	0.38	0.38
Estearico (C18:0)	3.86	3.27	3.23	3.36
Araquidico (C20:0)	0.26	0.22	0.19	0.71
Total AGS	17.51	24.31	25.40	25.94
Pentadecanoico (C15:1)	0.04	0.31	0.31	0.34
Palmitoelaidico (C16:1)	0.08	0.10	0.13	0.09
Palmitoleico (C16:1)	0.44	4.11	4.49	4.42
cis10-heptadecenoico (C17:1)	0.07	0.29	0.55	0.57
Oleico (C18:1)	27.78	20.41	20.30	18.86
cis-vaccenico (C18:1)	0.72	2.23	3.05	2.31
Eicosenoico (C20:1)	0.28	1.32	1.19	1.48
Total AGM	29.40	28.76	30.03	28.07
Erucico (C22:1)	0.11	0.16	0.82	0.94
Linoléico (C18:2 n6)	43.71	20.36	21.33	20.49
CLA c9,t11 y c11,t9 (C18:2)	0.00	1.33	1.31	1.48
CLA t10,c12 (C18:2)	0.00	0.09	0.12	0.13
γ -linolénico (C18:3 n6)	0.00	0.14	0.15	0.16
α -linolénico (C18:3 n3)	4.54	1.60	1.47	1.54
cis-11,14-eicosadienoico (C20:2)	0.04	0.11	0.11	0.11
cis-11,14,17eicosatrienoico (C20:3)	0.04	0.06	0.08	0.10
cis-8,11,14-eicatrienoico (C20:3)	0.04	0.23	0.12	0.10
Araquidónico (C20:4 n6)	0.19	0.45	0.48	0.42
Eicosapentaenoico (C20:5 n3)	0.30	8.05	7.73	8.65
Docosapentaenoico (C20:5 n6)	0.00	0.16	0.15	0.17
Docosapentaenoico (C22:5 n3)	0.00	1.08	0.99	1.16
Docosahexaenoico (C22:6 n3)	0.07	6.11	5.52	6.39
Total AGPI	49.04	39.93	40.38	41.85
Otros ácidos grasos	4.05	7.00	4.20	4.14
Total n6	43.90	21.12	22.11	21.24
Total n3	4.91	16.83	15.71	17.74
n6:n3	8.94	1.25	1.41	1.2
Lípidos totales (g/100g muestra)	4.35	4.25	4.17	4.44

T1-DB, T2-DB+2.5% AS, T3-DB+2.5%+4% AM, T4-DB+2.5% AS+8% AM

AGS-ácidos grasos saturados, AGM-ácidos grasos moninsaturados, AGPI-ácidos grasos poliinsaturados

de 16 horas de luz. Agua y alimento fueron suministrados *ad libitum*. Se llevó registro del consumo de alimento, producción de huevo y peso del huevo. Al final de cada semana se hizo un resumen semanal de las variables antes mencionadas, así como, de la masa de huevo y de la conversión alimenticia.

El estudio se condujo en conformidad con las políticas establecidas por el Comité de Ética para el Cuidado de los Animales, de la Fac.Med.Vet.Zoot., UNAM.

Evaluación del color de la yema con el Abanico Roche

Al final de la cuarta semana de experimentación se tomaron al azar 25 huevos de cada tratamiento (5 por réplica) para medir el color de la yema, de acuerdo a los valores del abanico colorimétrico Roche, cuyos valores van del 1 al 15, correspondiendo el número 1 a un color amarillo muy pálido y el 15 a un amarillo-naranja muy intenso.

Evaluación sensorial del huevo

Al final de las cuatro semanas de experimentación, se realizó una prueba de evaluación sensorial en cabinas individuales en el Laboratorio de Evaluación Sensorial del Depto. de Ciencia y Tecnología de los Alimentos del INCMNSZ. Se aplicó una prueba afectiva para medir el grado de aceptación por el sabor del huevo y el color de la yema (Anzaldúa-Morales, 1994). En los dos casos se utilizó una escala ordinal de cinco puntos. Participaron 30 jueces no entrenados, de ambos sexos, consumidores habituales de huevo.

a) Sabor del huevo

De cada tratamiento se tomaron al azar 8 huevos, se revolviaron y frieron en una sartén con aceite en aerosol (PAM^{MR}). En ninguno de los casos se adicionó sal u otro sazoador. A cada tratamiento se le asignó una clave de tres dígitos, tomados de una tabla de números aleatorios (Meilgaard et al. 1999).

En una charola, se colocó un plato con las diferentes muestras de huevo revuelto, junto con una pieza de pan blanco y un vaso de agua (que entre muestra y muestra debería consumir el panelista a fin de eliminar sabores residuales) y un cuestionario para indicar el grado de aceptación para cada una de las muestras. Dentro de la cabina se utilizó luz roja

para evitar que el panelista se dejará influir por el color del huevo al evaluar el sabor del mismo.

b) Color de la yema

Se tomó un huevo de cada tratamiento, cada yema se colocó en recipientes de plástico transparente sobre un fondo blanco, asignando a cada yema una clave de tres dígitos (diferente a la empleada en la evaluación del sabor), tomados de una tabla de números aleatorios (Meilgaard et al. 1999).

A cada panelista se le entregaba una charola con las yemas de los diferentes tratamientos a evaluar. Junto con ello se les daba un cuestionario donde indicaban el grado de aceptación por el color de la yema de cada tratamiento, de acuerdo a la escala de cinco puntos que ahí se señalaban. Dentro de la cabina se utilizó luz blanca.

Se cerró la ventanilla de la cabina (para permitir la concentración del panelista) y se esperó la señal (luz de color rojo) que indicaba que había concluido su evaluación. En ese momento se abría la ventanilla para recoger los cuestionarios.

Análisis de la composición en ácidos grasos del huevo

Al final de la cuarta semana de experimentación se tomaron al azar 30 huevos de cada tratamiento (6 por réplica). 10 de ellos se mezclaron con una batidora para formar un “pool”, de allí se tomaron 10 alícuotas de 1 g para realizar la extracción lipídica con cloroformo:etanol (1:1) (AOAC 2000, método 923.07) y metilar los ácidos grasos con trifluoruro de boro al 20% en una solución metanólica al 2% (AOAC 2000, método 969.33) (Anexos 10.3 y 10.4). Las 20 piezas restantes de cada tratamiento, se conservaron a temperatura ambiente (20°C), para efectuar estos mismos análisis a los 30 y 60 días siguientes. Las muestras se inyectaron en un cromatógrafo de gases Varian, modelo 3380 CX equipado con un automuestreador CP8400, detector de ionización de flama y columna DB23 de 30 m con un d.i. de 0.25mm.

Determinación de la oxidación lipídica mediante la prueba de TBARS

En la cuarta semana de experimentación se tomaron de cada tratamiento 30 huevos. Al siguiente día, después de la recolección, a 10 de ellos se les determinó el grado de oxidación lipídica en yema, utilizando el método del ácido tiobarbitúrico (TBARS) (Salih et al. 1987; Botsoglou et al.1994). Las 20 piezas restantes se conservaron a temperatura ambiente (20°C), para efectuar el mismo análisis (n=10) a los 30 y 60 días siguientes (Anexo 11.3).

Diseño Experimental del Estudio

El estudio fue prospectivo, comparativo y experimental. El modelo estadístico utilizado para las variables productivas y el color de la yema fue conforme a un diseño completamente al azar, siendo el siguiente:

$$Y_{ij} = \mu + T_i + \xi_{ij} \quad \text{donde:}$$

Y_{ij} = Valor de la variable de respuesta en el tratamiento i , repetición j .

μ = media general

T_i = Efecto del tratamiento i .

ξ_{ij} = Error experimental del i -ésimo tratamiento de la j -ésima repetición.

El diseño empleado para la concentración de lípidos totales, ácidos grasos y malonaldehído (MDA) en el huevo, fue uno completamente al azar, con arreglo factorial 2x3, donde los factores a considerar fueron la dieta (testigo y experimental) y el tiempo de conservación del huevo (0, 30 y 60 d) a temperatura ambiente. El modelo estadístico asociado a este diseño fue el siguiente:

$$Y_{ijk} = \mu + A_i + B_j + A_i * B_j + \xi_{ijk}$$

donde:

Y_{ijk} = Variable de respuesta debido al efecto de la dieta y el tiempo de conservación

μ = media general

A_i = Efecto de la i -ésima dieta

B_j = Efecto del j -ésimo tiempo de conservación

$A_i * B_j$ = Interacción entre la dieta y el tiempo de conservación

ξ_{ijk} = Error experimental del i -ésimo tratamiento de la j -ésima repetición.

Análisis estadístico

Los datos de las variables productivas y el color de la yema (medido con el abanico Roche) se analizaron mediante un análisis de varianza para un diseño completamente al azar y para la comparación de medias se utilizó la prueba de Tukey ($P < 0.05$) (SAS, 2008).

Los datos obtenidos en la prueba de evaluación sensorial se analizaron mediante la prueba no paramétrica de rangos de Wilcoxon con una significancia de 0.05 (SAS, 2008).

Los datos de las variables concentración de lípidos totales, ácidos grasos y MDA en huevo se analizaron conforme a un diseño completamente al azar con arreglo factorial 2x3, siendo un factor la dieta y el otro el tiempo. Se utilizó el PROC GLM de SAS (SAS, 2008) para el análisis de los datos. La comparación entre medias se hizo con la prueba de Tukey ($P < 0.05$).

Resultados

Aceite de soya

Los AG que predominaron en este aceite fueron los poliinsaturados (AGPI), contribuyendo el ácido linoleico (C18:2 n6 LA) con 87% y el α - linolénico (C18:3 n3 ALA) con 11%; seguidos por los monoinsaturados (AGM), donde el oleico (C18:1 n9) contribuyó con 94%; y por último los saturados (AGS), en cuyo caso el palmítico (C16:0) constituyó casi el 70% del total y el esteárico 25%. Predominaron en este aceite, los n6 mas que los n3 (53% vs 7%) (Cuadro 15).

Aceite de sardina

La composición en AG de este aceite difirió considerablemente del aceite de soya. En el de sardina predominaron los n3 mas que los n6 (27% vs 15%), siendo el EPA y DHA, los AGn3 representativos de este aceite (Cuadro 15).

Algas marinas

En las algas del género *Sargassum* spp. los ácidos grasos predominantes resultaron ser el palmítico (C16:0), el oleico (C18:1 n9), el linoleico (C18:2 n6), el docosapentanoico (C22:5 n3) y el docosaheptanoico (C22:6 n3).

Composición de las dietas

En la dieta testigo (T1), predominaron los AGn6 (44%), principalmente el LA, manteniendo una relación n6:n3 muy alta de 9:1. De los AGn3, el ALA estaba presente en baja concentración (4.5%) y solo trazas de EPA y DHA (Cuadro 11).

Las dietas de los tratamientos T2, T3 y T4 que incluían aceite de sardina, tenían una menor concentración de AGn6 que la dieta T1 (21% - 22% vs 44%), pero una mayor concentración de AGn3 (16 - 18 vs 5%), principalmente de EPA y DHA. En estas dietas la relación n6:n3 fue de 1:12 – 1.4, mientras que en la testigo fue de 9:1.

Las tres dietas que incluían AS tenían mas EPA (7.7% - 8.6% TAG) que DHA (5.5 – 6.4%). La dieta testigo solo contenía trazas de ambos AG.

Variables productivas

Suplementar las dietas con el aceite de sardina no afectó el consumo de alimento y el peso del huevo. La producción de huevo se redujo 7%, y la masa de huevo 5.2 g sin embargo, las diferencias no fueron significativas ($P > 0.05$). La coloración de la yema, se vio favorecida, pasando de un valor de 9 a 10 de la escala colorimétrica Roche ($P < 0.05$). no resultaron afectados ($P > 0.05$) (Cuadro 17).

Incorporar algas marinas del género *Sargassum* a dietas suplementadas con AS ocasionó que la producción de huevo, el peso y la masa del mismo se redujeran significativamente ($P < 0.05$). La conversión alimenticia también se vio afectada en forma negativa ($P < 0.05$). El color de la yema también aumento ($P > 0.05$). En el caso particular del T4, donde 8%AM fueron adicionadas a la dieta, además de los decrementos ya mencionados, el consumo de alimento también se redujo, pero el color de la yema fue mas intenso (Cuadro 17).

Evaluación sensorial

El grado de aceptación de los panelistas por el color de la yema fue mayor para los tres tratamientos donde la dieta fue suplementada con AS ($P<0.05$). Aunque los tratamientos donde se incorporaron algas marinas mostraron una mayor puntuación que en el tratamiento que solo tenía AS, la diferencia no fue significativa entre ellos tres ($P>0.05$). El sabor del huevo no fue afectado ni por la suplementación de las dietas con AS ni por la incorporación de algas marinas a la misma ($P>0.05$) (Figura 15).

Cuadro 17. Variables productivas y color de yema obtenidos al suplementar la dieta para gallinas ponedoras con aceite de sardina y alga marina *Sargassum* spp., en forma combinada

	T1	T2	T3	T4
Consumo de alimento (g/ave/d)	115.00 ± 7.13 a	110.85 ± 10.26 ba	115.51 ± 6.11a	107.58 ± 7.30 b
Producción de huevo (%)	84.31 ± 7.52 a	77.28 ± 7.64 ba	73.02 ± 12.17 bc	69.02 ± 6.61 c
Peso de huevo (g)	67.25 ± 1.78 a	66.64 ± 4.33 a	64.17 ± 1.69 b	61.88 ± 2.43 b
Masa de huevo (g)	56.77 ± 6.07 a	51.60 ± 6.84 ba	46.23 ± 9.27 bc	42.72 ± 4.36 c
Conversión alimenticia	2.06 ± 0.22 c	2.28 ± 0.41 bc	2.59 ± 0.61 ba	2.67 ± 0.47 a
Color de yema	8.74 ± 1.11 c	9.60 ± 0.49 b	9.82 ± 0.38 ba	10.18 ± 0.52 a

a, b, c En cada renglón, literales distintas indican diferencia estadística ($P \leq 0.05$)

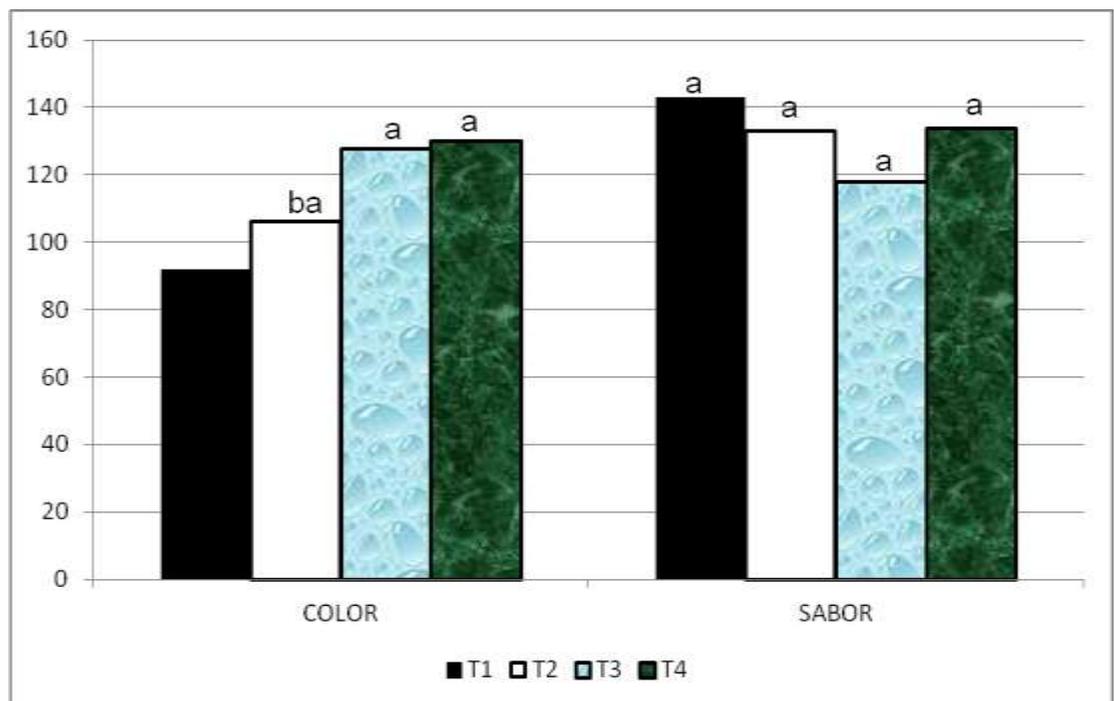
T1- dieta base (DB), T2- DB+ 2.5%AS, T3- DB+AS+4%AM, T4-DB+AS+8%AM

Lípidos totales y ácidos grasos en el huevo

El contenido de lípidos totales en T1 (DB) y T2 (DB+AS) no fue afectado en forma alguna ni por el tiempo ni por la suplementación con AS ($P>0.05$). Sin embargo, cuando 4% y 8% de algas marinas fueron incorporadas en la dieta suplementada con AS, el contenido de LT en estos dos tratamientos mostró los valores mas bajos en el día 0 ($P<0.05$). En el primer caso la reducción fue de 11% y en el segundo de 17% (Cuadro 18).

Al suplementar la dieta con AS la concentración total de AGS aumentó significativamente ($P<0.05$). Incorporar algas marinas a estas dietas aumentó la concentración de estas grasas en el huevo en el día 0 ($P<0.05$), pero conforme avanzó el tiempo de conservación del huevo, los valores disminuyeron significativamente ($P<0.05$).

Asimismo, cuando se suplementó la dieta con AS, la concentración de AGM también se incrementó pero se mantuvo constante durante los 60 días ($P < 0.05$). En los tratamientos que, además del AS, tenían 4% y 8% de algas marinas la concentración total de AGM disminuyó conforme pasó el tiempo ($P < 0.05$). Fue el ácido oleico el que manifestó principalmente este comportamiento. El ácido *cis*-vaccénico no se modificó a lo largo de los 60 d, en cada uno de los cuatro tratamientos ($P > 0.05$)(Cuadro 18).



^{a,b} En cada variable, literales distintas indican diferencia estadística ($P < 0.05$).

T1- dieta testigo, T2- DT+ AS, T3- DT+AS + 4%AM, T4-DT+AS+8% AM

Figura 15. Aceptación por el color de la yema y sabor del huevo cuando se incorporaron algas marinas a la dieta suplementada con aceite de sardina (total de puntos)

La concentración total de AGPI en el huevo se redujo significativamente ($P < 0.05$) en los tratamientos que incluían AS (T2, T4 y T5), principalmente como consecuencia de la disminución del ácido linoleico en estos tratamientos ($P < 0.05$)(Cuadro 18). Sin embargo, contrario a lo observado en el T1, donde el contenido de AGPI en el huevo se redujo

significativamente en el día 60, en el tratamiento donde la dieta estaba suplementada con solo AS, la concentración de estos AG se mantuvo constante a lo largo de los 60 días ($P>0.05$); mientras que en aquellos que además tenían algas marinas (T4 y T5) se observaron valores mas altos en el día 60 ($P<0.05$).

Aunque en el T1, el huevo tenía una mayor concentración del ácido linoleico, este ácido graso mostró una reducción significativa (13%) en el huevo en el día 60 ($P<0.05$), mientras que en los otros tres tratamientos donde la dieta estaba suplementada con AS no ocurrió esto, por lo contrario la concentración de este AG en el día 60 no cambió con respecto al día 0 y/o 30 ($P>0.05$).

Si bien es cierto que en los tratamientos con AS había menos LA en el huevo, también lo es el hecho de que estos tenían una mayor concentración de AGn3, particularmente de DHA ($P<0.05$).

Por otra parte, la presencia de las algas marinas en la dieta suplementada con AS favoreció aún mas una mayor concentración de AGn3 en el huevo, particularmente de DHA ($P<0.05$), de hecho los valores mas altos se observaron en el T4 (DT+AS+8%AM) ($P<0.05$) (Cuadro 18).

La relación n6:n3 en el T1 fue significativamente diferente de los tratamientos que contenían AS ($P<0.05$). En el primero fue de 11:1, mientras que en los demás fue de 2:1 y en general, ésta no se modificó a lo largo de los 60 días de conservación ($P>0.05$). DHA ($P<0.05$), de hecho los valores mas altos se observaron en el T4 (DT+AS+8%AM) ($P<0.05$) (Cuadro 18).

La relación n6:n3 en el T1 fue significativamente diferente de los tratamientos que contenían AS ($P<0.05$). En el primero fue de 11:1, mientras que en los demás fue de 2:1 y en general, ésta no se modificó a lo largo de los 60 días de conservación ($P>0.05$).

Cuadro 18. Contenido de lípidos totales y ácidos grasos en el huevo conservado durante varios días a temperatura ambiente al suplementar la dieta para gallinas ponedoras con aceite de sardina y algas marinas *Sargassum* spp en forma combinada

Componente químico	T1			T2			T3			T4		
	0	30	60	0	30	60	0	30	60	0	30	60
Mirístico (C14:0)	0.34 f	0.38 e	0.35 fe	0.48 bc	0.54 a	0.52 a	0.44 d	0.54 a	0.47 c	0.46 dc	0.53 a	0.51 ba
Palmítico (C16:0)	24.62 g	24.88 gf	24.89 gf	26.90 a	26.40 b	26.06 c	26.19 cb	25.28 ed	25.21 e	25.37 ed	25.10 ef	25.53 d
Esteárico (C18:0)	8.57 e	8.88 d	8.45 fe	7.95 h	8.31 fg	8.22 g	9.14 c	9.25 c	8.89 d	10.33 a	9.85 b	9.28 c
Total AGS	33.53 h	34.14 g	33.69 h	35.34 cd	35.25 cd	34.80 ef	35.77 b	35.07 ed	34.57 f	36.16 a	35.49 cb	35.32 cd
Oleico (C18:1)	40.90 e	40.93 de	42.15 bc	42.66 ba	42.63 ba	42.64 ba	43.22 a	41.68 dc	42.16 bc	42.23 bc	41.03 de	40.35 e
Cis-vaccénico (C18:1)	1.57 ba	1.50 b	1.47 b	1.87 a	1.71 ba	1.80 ba	1.54 ba	1.62 ba	1.44 b	1.72 ba	1.56 ba	1.46 b
Palmitoleico (C16:1)	2.33 e	2.34 e	2.55 d	3.61 a	3.31 b	3.40 b	2.78 c	2.75 c	2.16 d	2.40 e	2.58 d	2.77 c
Total AGM	44.80 c	44.77 c	46.17 b	48.14 a	47.65 a	47.83 a	47.54 a	46.05 b	46.21 b	46.35 b	45.16 c	44.59 c
Linoleico (C18:2 LA n6)	15.95 a	16.03 a	13.90 b	9.46 h	9.85 g	9.52 hg	8.63 i	10.77 ed	10.83 d	10.42 ef	10.35 f	11.24 c
γ-linolenico (C18:3 GLA n6)	0.13 b	0.15 a	0.04 f	0.06 dc	0.05 de	0.05 fe	0.06 dc	0.07 c	0.07 c	0.08 c	0.08 c	0.07 c
α-linolenico (C18:3 ALA n3)	0.65 a	0.67 a	0.52 b	0.37 d	0.38 dc	0.37 d	0.27 e	0.35 d	0.34 d	0.35 d	0.37 dc	0.41 c
Araquidónico (C20:4 AA n6)	1.82 ba	1.80 b	1.90 a	0.65 fe	0.63 f	0.71 fe	0.71 e	0.72 de	0.79 dc	0.84 c	0.79 dc	0.71 e
Eicosapentaenoico (C20:5 EPA n3)	0.00 f	0.04 e	0.02 fe	0.41 dc	0.39 d	0.53 ba	0.51 b	0.41 dc	0.50 b	0.43 c	0.56 a	0.50 b
Docosapentaenoico (C22:5 DPA n6)	0.33 a	0.30 b	0.35 a	0.03 c	0.00 d	0.03 c	0.04 c	0.03 c	0.03 c	0.05 c	0.04 c	0.04 c
Docosapentaenoico (C22:5 DPA n3)	0.11 g	0.11 g	0.12 g	0.35 ef	0.38 ed	0.39 d	0.63 c	0.31 f	0.41 d	0.51 c	0.58 b	0.50 c
Docosahexaenoico (C22:6 DHA n3)	0.84 g	0.85 g	0.92 g	3.12 f	3.08 f	3.26 fe	3.68 bc	3.40 de	3.57 dc	3.42 de	3.86 ba	3.98 a
Total AGPI	19.84 a	19.95 a	17.77 b	14.46 f	14.76 f	14.85 f	14.52 f	16.06 e	16.55 dc	16.09 de	16.63 c	17.45 b
Total n6	18.24 a	18.29 a	16.18 b	10.20 g	10.53 g	10.30 g	9.44 h	11.59 de	11.73 dc	11.38 fe	11.26 f	12.06 c
Total n3	1.60 g	1.66 g	1.59g	4.26 f	4.23 f	4.55 ced	5.09 b	4.48 fed	4.82 cb	4.72 cbd	5.37 a	5.39 a
n6:n3	11.41 a	11.03 a	10.20 b	2.42 c	2.50 c	2.27 dc	1.87 d	2.59 c	2.44 c	2.42 c	2.10 dc	2.26 dc
Lípidos totales (g/100g)	11.74 bac	11.49 bc	11.34 c	11.41 bc	11.58 bac	11.60 bac	10.46 d	12.07 a	11.48 bc	9.70 e	11.94 ba	11.63 bac

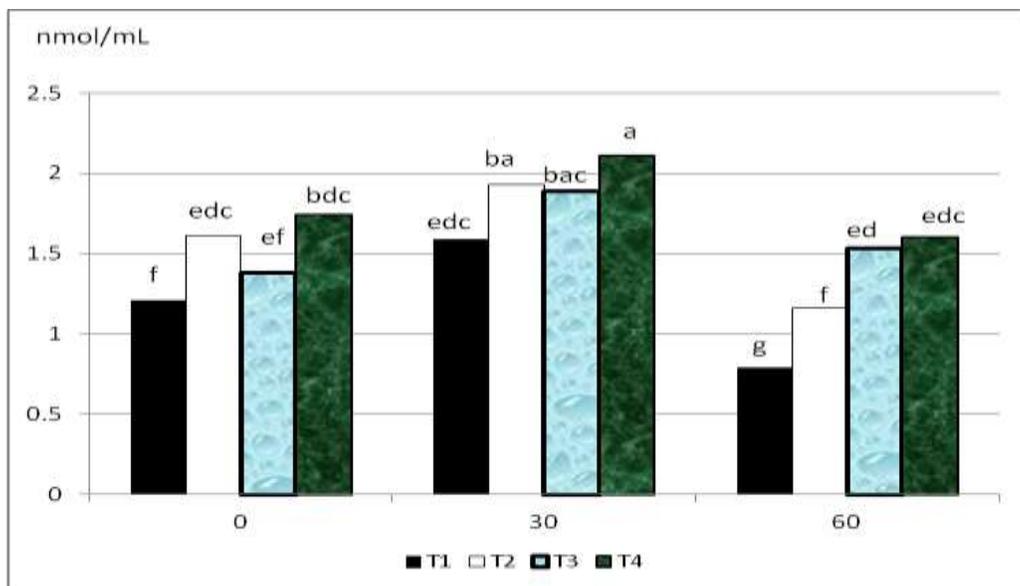
¹en 100 g de huevo completo (yema+clara), ²TAG=total de ácidos grasos

a, b, c, d,e,f En cada renglón, literales distintas indican diferencia estadística (P≤ 0.05)

T1- dieta base (DB), T2- DB+ AS, T3- DB+AS + 4%AM, T4-DB+AS+8%AM

Malondialdehido (MDA) en yema

Desde el primer día de conservación, los resultados mostraron la formación de MDA en las yemas de todos los tratamientos ($P>0.05$); sin embargo, el efecto fue mas evidente y significativo cuando las dietas fueron suplementadas con AS+8%AM ($P>0.05$). A los 30 días de conservación hubo una mayor formación de MDA en todos los tratamientos, particularmente en aquellos donde la dieta esta suplementada con AS ($P>0.05$). A los 60 días, contrario a lo esperado, los valores de MDA en todos los tratamientos fueron significativamente menores a los observados en el día 30 ($P>0.05$). Particularmente en T1 y T2 los valores fueron mas bajos aun ($P>0.05$)(Figura 16).



^{a,b} En cada variable, literales distintas indican diferencia estadística ($P< 0.05$).

T1- dieta base (DB), T2- DB+ AS, T3- DB+AS + 4%AM, T4-DB+AS+8%AM

Figura 16. Concentración de MDA (nmol/mL) en la yema de huevos conservados durante varios días a temperatura ambiente al suplementar la dieta de las gallinas con aceite de sardina junto con algas marinas *Sargassum* spp.

Discusión

Aceites y algas

Tal como se observó en los resultados, existe una gran diferencia en la composición de ácidos grasos entre los aceites vegetales y los de origen marino. Los aceites vegetales poseen ácidos grasos de cadena larga de 18 o menos carbonos (ej. aceite de soya, de oliva, canola, linaza); mientras que los de origen marino se caracterizan por tener ácidos grasos de cadena mas larga (C20-C24) (Bailey,1984; Ackman, 2005).

El perfil de AG del aceite de sardina (AS) utilizado en el presente estudio, resultó similar a lo reportado por otros autores (Gámez-Meza et al. 1999; Ackman, 2005; Bandarra et al., 2007; Noriega-Rodríguez et al. 2009). Aunque el ácido esteárico (C18:0) se encontró en altas concentraciones en el AS, este tiene poca o ninguna influencia sobre la capacidad de aumentar el nivel de colesterol sérico, contrario al efecto que el resto de los AGS ocasionan (Conchillo et al. 2006).

El hecho de que el AS tuviera mas EPA (C20:5 n3) que DHA (C22:6 n3) concuerda con lo hallado por otros autores en especies grasosas semejantes a la sardina, tal es el caso de los aceites crudos de sábalo (EPA fluctua entre 11.1% - 16.3% y el DHA de 4.6% - 13.8%), de arenque americano (EPA varia entre 3.9 - 15.2% y DHA 2.0 -7.8%) (Stansby, 1991); de anchoas (EPA 22% y DHA 9%) y de menhaden (EPA 21% y DHA 7%). Los aceites de atún por lo contrario, tienen más DHA (21%) que EPA (8%) (Bimbo, 1999; Cachaldora et al. 2006). En consecuencia, la dieta experimental que incluía aceite de sardina, tenía mas EPA (3.6-3.9%) que DHA (0.43-0.51%).

Por otra parte, aunque las algas marinas tienen un bajo contenido energético (1.0 – 3.0 kcal/g) y de lípidos (0.3% – 4.0%), son una excelente fuente de ácidos grasos esenciales, como el linoleico (C18:2 n6) y alfa-linolenico (C18:3 n3), así como de los precursores de eicosanoides, el ácido araquidónico (C20:4 n6) y eicosapentaenoico (C20:5 n3) (Yuan, 2008). Los valores de AG encontrados en *Sargassum* spp concuerdan con lo informado por Sánchez-Machado et al. (2004) y Yuan (2008).

Variables productivas

Los resultados obtenidos concuerdan con lo informado por Cachaldora et al. (2006,2007), quienes no encontraron efecto alguno sobre el consumo de alimento y peso del huevo al suplementar la dieta de las aves con diferentes tipos de aceites de pescado y diferentes niveles de inclusión del mismo (1.5%, 3%, 4.5% y 6.0%). En el color de la yema observaron una interacción entre el tipo y concentración del aceite de menhaden, incrementándose ésta cuando las gallinas recibieron aceite de menhaden MFO1 (que tenía 8.3% de EPA y 8.2% de DHA), en comparación con MFO2 y MFO3 cuyas proporciones de estos dos AG eran diferentes (EPA 21% y DHA 7% en MFO2; EPA 8% y DHA 21% en MFO3).

Pappas et al. (2006) observaron una significativa reducción en el peso del huevo al suministrar a las aves, dietas suplementadas con 5.5% de aceite de pescado. Cherian (2008) informa un decremento en el peso del huevo y en el color de la yema al adicionar 3.5% de aceite de pescado a la dieta.

Otros autores observaron una reducción tanto en la producción como en el peso del huevo, al suplementar la dieta para gallinas ponedoras con aceite de pescado (Hargis y Van Elswyk, 1993; Cloughley et al.1997; Maurice, 1994; González-Esquerria y Leeson, 2001; Surai y Spark, 2001), con 4.8% de una microalga marina con alto contenido de DHA (Herber-McNeill y Van Elswyk, 1996), y cuando han utilizado al cebo (5 a 7%) como única fuente de grasa en dietas para gallinas ponedoras (Watkins y Elkin 1992, Grobas et al. 2001, González-Muñoz et al. 2009)

Cornejo et al. (2008) y Cherian et al. (2007) no encontraron cambios en las variables productivas al incorporar 6% de AP en el primer caso; así como 0.25% y 0.5% de AP en el segundo caso.

Algunos autores (Van Elswyk 1997a; González-Esquerria y Lesson, 2001; Cachaldora et al. 2006) señalan que la disminución observada en la producción y/o peso del huevo pudiera deberse al efecto reductor de los AGn3 sobre la cantidad de lípidos y estradiol en suero (lo que limitaría la disponibilidad de lípidos para la formación de yema). Sin embargo, otro factor pudiera ser el hecho de que al suministrar en la dieta ingredientes con alto contenido de AGn3, se reduce la concentración del ácido linoleico (C18:2 n6 LA)

y por ende la producción de la PGE₂ (Simopoulos, 2006, 2008). Algunos estudios (Hertelendy y Biellier, 1978; Hudelson y Hudelson, 1996), han demostrado que la PGE₁ y la PGE₂ son de gran importancia en el proceso reproductivo, estimulan las contracciones, relajan el esfínter uterovaginal y la vagina facilitando la ovoposición en la gallina. Por lo tanto, al existir en el ave un decremento en la producción de estas hormonas como consecuencia de la reducción sérica del LA, precursor del AA y este de eicosanoides como la PGE₁ y PGE₂, la producción y peso del huevo se ven afectadas (Lee y Hwang, 2008; Simopolous, 2008).

Los efectos negativos observados al adicionar algas marinas a las dietas suplementadas con AS difieren de lo observado por Carrillo et al. (2008) quienes al suplementar la dieta de las gallinas con 2% de aceite de pescado+10% de Sargassum sinicola, no encontraron efecto alguno sobre las variables productivas. El-Deek y Al-Harhi (2009c) tampoco observaron efecto alguno sobre las variables productivas y calidad física del huevo cuando suplementaron la dieta de las aves hasta con 12% de Sargassum dentifebium, en la ración. Sin embargo, en otros ensayos (Rojkind, 1972; Carrillo et al. 2012) si han hallado una reducción en los valores de la variables productivas, atribuyendo dicho efecto al bajo contenido energético de las algas, que al ser incluidas en las raciones disminuyen la densidad energética de las mismas, otros mas lo atribuyen al alto contenido de sales y de polisacáridos indigestibles (Ventura et al. 1994).

Coloración de la yema

El aumento en la coloración de la yema cuando la dieta fue suplementada con AS, seguramente se debió a la presencia de pigmentos en el aceite de pescado, los cuales varían de acuerdo a la alimentación de los peces (Bailey, 1984; Roldan-Libenson et al. 1999). En el caso de la sardina, su principal alimento es el fitoplancton (Cellamare y Gómez, 2007), el cual posee pigmentos tales como clorofila, antocianinas, luteína, diatoxantina, diadinoxantina, prasinoxantina, fucoxantina, peridinina, zeaxantina y violaxantina (Millan et al. 2004). Por lo tanto, en el aceite de sardina seguramente estos pigmentos estaban presentes y las xantofilas fueron depositadas en la yema de huevo.

Por otra parte, el hecho de que las yemas hayan estado mas pigmentadas en el T2 que en el T1 es un aspecto positivo que indica que el aceite de sardina utilizado estaba en buenas condiciones, ya que cuando existe un proceso de oxidación, las propiedades cromógenas pueden reducirse, ya que los carotenoides están formados por cadenas hidrocarbonadas altamente insaturadas (Bailey, 1984; Clydesdale, 1998).

Fue interesante observar que con las algas marinas este efecto fue mas intenso, particularmente con 8% de *Sargassum*. Esto también ha sido observado por diferentes autores. Herber-McNeill y Van Elswyk (1996) observaron que al enriquecer el huevo con ácidos grasos n3 suplementando la dieta con una microalga marina, los consumidores aceptaron bastante bien el huevo. Cuando Strand et al. (1998) incorporaron 15% del alga parda *Fucus serratus* a la dieta de ponedoras, encontraron que el color de las yemas aumento de 6 a 9 del abanico Roche y la pigmentación también. Las yemas del grupo testigo contenían aproximadamente 1.4 ug de carotenoides/g de yema (principalmente luteína y zeaxanthin). Las yemas de las gallinas alimentadas con AM contenían al inicio 1.0 ug de carotenoides/g de yema, la cantidad fue aumentando hasta alcanzar un plateau aproximadamente a los 8-11 días de experimentación; algunas yemas contenían 4.8-4.9 ug de carotenoides/g de yema, pero otras contenían hasta 8 ug/g de yema. Rendon et al. (2003) observaron valores de hasta 13 del abanico Roche, cuando suplementó la dieta de las aves con 5% del residuo de los alginatos. Al-Harhi y El-Deek (2012) obtuvieron incrementos notables en la coloración de la yema con 3% y 6% de *Sargassum dentifebium*, alcanzando con 6% del alga, concentraciones en el huevo de 25 mg/kg vs 23 mg/kg de carotenos del grupo testigo; y 16.2 vs 15.5mg/kg de luteína+zeaxantina.

Las algas marinas poseen una gran variedad de pigmentos, tales como el beta-caroteno 16%, zeaxantina 1%, luteoxantina 7%, violaxantina 7%, z-violaxantina 3%, fucoxantina 52% y z-fucoxantinas 14% (Strand, 1998; Miyashita y Hosokawa, 2008; Yuan, 2008), que al depositarse en la yema puede resultar en beneficio del consumidor.

Esto es de gran interes no solo para el avicultor sino también para el consumidor, ya que como señala Clydesdale (1998) la apariencia visual, especialmente el color, es la característica más importante de los alimentos que determina ser seleccionado para su consumo. Sin embargo, los beneficios de incrementar la coloración de la yema a través de

carotenoides naturales van más allá del atractivo visual. Estudios realizados por Chung et al. (2004) y Goodrow et al. (2006) revelan que los pigmentos presentes en la yema de huevo, principalmente luteína y zeaxantina, tienen una alta biodisponibilidad en el humano y son importantes en la prevención de cataratas y degeneración macular en la retina. Asimismo, Miyashita y Hosokawa (2008) señalan los múltiples beneficios que la fucoxantina tiene en la salud de los consumidores; y otros autores también señalan la gran importancia que los pigmentos tienen como antioxidantes (Strain y Benzie, 1999; Bou et al. 2009).

Evaluación sensorial

El hecho de que no se haya detectado diferencia entre los dos tratamientos, en el grado de aceptación por el color de la yema, aun cuando las yemas del T2 (DB+AS) estaban más pigmentadas, pudiera deberse a dos razones. La primera es que la prueba utilizada era subjetiva, por lo que los resultados están dados en base a la apreciación visual de cada panelista lo que origina una amplia variación. Por lo mismo, sería recomendable aumentar el número de participantes. En segundo lugar, pudiera ser indicativo de que el aceite utilizado en el presente estudio era de buena calidad, procesado a partir de pescado fresco y estaba protegido con antioxidante.

Es importante señalar que aun cuando el aceite de pescado sea de buena calidad, el sabor a pescado que pudiera adquirir el huevo, pudiera ser resultado de la rancidez en las dietas suplementadas con el aceite de pescado. Por lo tanto, es de gran importancia asegurarse también de que las dietas que se van a emplear, estén protegidas con antioxidantes, ya que una vez oxidado, ya sea el aceite como las dietas, la adición de antioxidantes no revertirá la situación (Surai y Spark, 2001).

El que no se haya afectado el sabor del huevo concuerda con lo observado por García-Rebollar et al. (2008) cuando suplementó dietas con 1.5 y 1.7% de aceite de pescado. Pero difiere de los resultados obtenidos por Adams et al. (1989) y Van Elswyk et al. (1992), donde los panelistas detectaron un sabor desagradable cuando la dieta de las aves fue suplementada con 6% y 3% de aceite de menhaden, respectivamente. Van Elswyk et al. (1995) hallaron un mayor contenido de compuestos volátiles de bajo, más que de alto,

peso molecular en huevos de gallinas cuyas dietas fueron suplementadas con aceite de menhaden, atribuyendo a estos la impartición de un sabor desagradable al producto.

González-Esquerri y Leeson (2000) hallaron que aun deodorizando el aceite de menhaden, el huevo adquiría el característico sabor a pescado. Bailey (1984) asocia el olor y sabor a pescado con la presencia de compuestos nitrogenados y glicéridos altamente insaturados y como consecuencia de la combinación química de estos compuestos, durante la oxidación de los glicéridos. También menciona que la presencia de aldehídos de peso molecular medio, en particular de los aldehídos caprílico y caprínico, formados por la oxidación y ruptura de una cadena de AG, pueden ser la causa de dichos efectos en el huevo.

Algunos autores consideran que el olor y sabor a pescado que el huevo adquiere cuando la dieta de las aves es suplementada con aceite de pescado, se debe a la reducción del óxido de trimetilamina y/o a la autooxidación de los AGn3, ya que estos son muy susceptibles a oxidarse (Belitz y Grosch, 1997; Surai y Spark, 2001; Eskin y Przybylski, 2001). Este efecto no solo ha sido observado con el AS sino también cuando la dieta ha sido suplementada con linaza (Surai y Spark, 2001).

En lo que respecta a las algas marinas, el hecho de que el sabor no se haya visto afectado por su inclusión en las dietas, concuerda con lo informado por diversos autores, que han utilizado algas marinas en la dieta de las aves aun en niveles altos (10%) y no encontraron afectación en el sabor del huevo (Herber-McNeill y Van Elswyk, 1998; Rendón et al. 2003; Carrillo et al. 2008; Sefer et al. 2011; Al-Harthi y El-Deek, 2012).

Asimismo, es pertinente recordar que la aceptación de sabor a pescado varía de un país a otro. Por ejemplo, en Chile la gente está acostumbrada a este sabor y lo acepta como normal, mientras que para los europeos, esto es inaceptable. (Surai y Spark, 2001).

Efecto de la suplementación de la dieta con AS sobre el contenido de lípidos totales y la composición en AG del huevo

El que la cantidad de lípidos totales en el huevo no haya sido afectada por el tipo de dieta concuerda con lo informado por Cherian *et al.* (1996), quienes al incorporar 3.5% de aceite de menhaden, aceite de palma, aceite de lino o aceite de girasol a dietas para gallinas,

no observaron cambio alguno en el contenido de lípidos en la yema. De igual manera Van Elswyk *et al.* (1992) y Castillo-Badillo *et al.* (2005) no detectaron diferencias en el contenido de lípidos totales cuando suplementaron la dieta con 3% de aceite menhaden y con 1 y 2% de ceite de atún, respectivamente. Esto indica que independientemente de la fuente (vegetal o marina) que se emplee para incrementar los AGn3 en el huevo, la cantidad total de lípidos no se verá modificada, pero sí la composición en ácidos grasos.

Aunque la composición en ácidos grasos del huevo, en general, fue un reflejo de la composición de las dietas; hubieron algunas excepciones. La **primera** es que aun cuando las dietas con AS, tenían aproximadamente 26% menos ácido oleico que la dieta testigo, en el huevo la concentración de este AG no solo se incrementó, sino hasta superó en 4.5% mas su concentración, con respecto al huevo del T1.

El **segundo** cambio notable fue que las dietas con AS tenían 137% mas araquidónico que la dieta testigo, pero en el huevo la concentración de este ácido se redujo 64%, en comparación con T1. Melluzzi *et al.* (2000), observaron éste mismo comportamiento (25.54 vs. 67.72 mg/egg de AA) como consecuencia de la suplementación con aceite de pescado; pero también observaron un incremento de todos los ácidos grasos n-3 en la yema; particularmente EPA (19.53 vs. 0.74 mg/egg) y DHA (143.70 vs. 43.66 mg/huevo).

Un **tercer** aspecto fue que en las dietas con AS existía una mayor concentración de EPA que DHA, sin embargo en el huevo sucedió lo contrario, había más DHA que EPA. Esto concuerda con lo observado por Huang *et al.* (1990) quienes informan que al suplementar la dieta de las gallinas con 3% de aceite de menhaden (11% EPA y 9% DHA), hay una mayor deposición de DHA en la yema (29 vs 192 mg de EPA y DHA respectivamente). La explicación a ello pudiera estar relacionada con el metabolismo de los AGn3 en las aves, donde al parecer existe una mayor preferencia de las enzimas para depositar DHA en los tejidos, así como una mayor eficiencia de retención del DHA en los mismos, tal como ocurre en el humano (Spreecher *et al.* 1995; González-Esquerria y Lesson, 2001; Alvarez *et al.* 2004).

Esto no quiere decir que el EPA sea menos importante, ambos cumplen funciones diferentes. A partir del EPA se forma una amplia variedad de compuestos biológicamente

activos conocidos como eicosanoides (prostaglandinas y leucotrienos), potentes reguladores de la actividad biológica; este AG es capaz de ser elongado a ácido docosapentaenoico (C22:5 n3 DPA) y este a su vez a DHA (C22:6 n3). El DHA, por su parte, puede ser retroconvertido a EPA, siendo su aspecto más significativo ser el principal componente estructural en las membranas celulares del sistema nervioso y de la retina. En éstas puede constituir aproximadamente el 60% de los AGPI presentes y es tal su importancia que algunas investigaciones señalan que una deficiencia de este ácido graso puede dar origen a algunas anomalías funcionales (Rice, 1999).

El que la relación n6:n3 en el huevo se redujera notablemente al suplementar las dietas con AS, pasando de 11:1 a una de 2:1, resulta ser de gran importancia, ya que habitualmente el huevo comercial tiene una alta proporción de n6, y un bajo contenido de n3 (9:1)(Surai y Spark, 2001; Seuss-Baum, 2007), similar a una típica dieta occidental (10:1), lo cual se asocia con un incremento en el riesgo de padecer enfermedades cardiovasculares, ciertos tipos de cánceres, etc. (Gebauer et al. 2008). La relación n6:n3 recomendada en una dieta habitual va de 1:1 a 4:1 (Yannakopoulos, 2007); ya que como se sabe, los n6 y los n3, son dos clases de AGPI metabólica y funcionalmente distintos con efectos fisiológicos opuestos, por lo que mantener un balance adecuado n6:n3 es de gran importancia, ya que ambos compiten por las mismas enzimas. Al parecer, los n3 son preferidos por las enzimas delta-desaturasas (Surai y Spark, 2001).

Por otra parte, la razón por la cual la cuantificación de los ácidos grasos se realizó hasta la cuarta semana fue que la incorporación de AGn3 procedentes de la dieta, en la yema es un proceso gradual, a los 9 días de experimentación se empiezan a notar los cambios en la composición de los AG en la yema y es a partir de los 21 días que la concentración de los AG se estabiliza (Cherian, 2007; Seuss-Baum, 2007). Yu and Sim (1987) suplementaron la dieta de las gallinas con diferentes niveles de inclusión de aceite de salmón, alcanzando la máxima incorporación de los n3 a los 8 días. Lin et al. (1995) suplementaron la dieta con 1.5% de aceite de menhaden y diariamente, por un periodo de 14 días, registraron la concentración de n3 en la yema, los resultados mostraron que a los 14 días la composición de AG en el huevo había sido modificada. Van Elswyk (1997a) alimentó a las aves con diferentes niveles de aceite de menhaden observando una

deposición gradual de n3 de la semana 0 a la 3, estabilizándose el contenido y la composición entre las semanas 3 y 4. Los tratamientos con los mas altos niveles de aceite de menhaden (AMH) alcanzaron mas pronto el plateau, que los tratamientos con bajos niveles. Despues de remover las dietas experimentales, el contenido de n3 en las yemas disminuyó 20% durante las dos primeras semanas, en la tercera se mantuvo constante y en la semana 4, los tratamientos con 0.5, 1% y 1.5%, alcanzaron los mismos valores que el grupo testigo. Estos resultados ilustran el turnover de los lípidos en la yema.

Efecto del tiempo sobre la composición en AG del huevo almacenado a temperatura ambiente

La formación de MDA, tanto en el tratamiento T1 como en los que se suplementó con AS, indica que desde el momento en que el huevo se expone a factores externos como la luz y la temperatura, se inicia el proceso oxidativo. Pero el hecho de haya una mayor cantidad de MDA en el T2, T3 y T4, también demuestra que suplementar la dieta con AS favorece aun mas la formación de radicales libres (RL).

Por otra parte, el hecho de que el perfil de ácidos grasos en general se haya mantenido constante durante los 60 días en que se mantuvo el huevo a temperatura ambiente (20 C) concuerda con lo señalado por otros autores quienes señalan que el perfil de AG de huevos enriquecidos con AGn3 no se altera durante el cocimiento (Van Elswyk et al.1992) o durante siete semanas de almacenamiento a 25 C (Oku et al. 1996). Aymond y Van Elswyk (1995), tampoco observaron cambios en los valores de TBARS en huevos enriquecidos con n3, cuando aceite de linaza fue incluido en la dieta de las aves, en comparación con el grupo testigo.

Otros en cambio, informan un incremento en la susceptibilidad a la oxidación durante al almacenamiento y cocimiento del huevo (Cherian et al., 1996).

Marshall et al. (1994) notaron que en el huevo fresco de gallinas cuya dieta había sido suplementada con 1.5% de aceite de menhaden, presentaba mayor concentración de sustancias reactivas al ácido tiobarbiturico (TBARS) que en el huevo de gallinas sin suplementar. Aun cuando a la dieta con aceite de menhaden se le habían adicionado 12.5

mg de alfa-tocoferol/ave/d (la recomendación del NRC para una dieta convencional es de 0.5 mg/ave/d). En el presente estudio, la adición de algas marinas a las dietas suplementadas con AS al parecer no ayudaron a detener el proceso oxidativo.

Es posible que los antioxidantes propios en el ave (carotenoides, vitamina E, fosvitina, selenio, etc), presentes en el huevo (Guérin-Dubiard et al. 2007), contribuyan a proteger a estos AG por la importancia fisiológica que tienen para el ave; y que los compuestos oxidados detectados desde el primer día de almacenamiento en ambos tratamientos mediante la prueba de TBARS hayan sido otros, diferentes a los AG. Marshall et al. (1994) sugieren que los TBARS en yema son el resultado de la transferencia directa de lípidos oxidados presentes en la dieta o producidos en el hígado y posteriormente transferidos a la yema junto con otros materiales lipofílicos.

La síntesis de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS) en el hígado de gallinas ponedoras ha sido confirmado por Caston et al. (1994) cuando comparó una dieta convencional como testigo contra otras que tenían 10 ó 20% de linaza molida. Encontraron un incremento de TBARS en el hígado, proporcional al nivel de inclusión de linaza en la dieta.

Aymond y Van Elswyk (1995) sugieren que las condiciones en las que se almacenan las dietas, tal como el uso de contenedores herméticos mantenidos en refrigeración, pueden reducir una potencial deposición de TBARS en la yema.

El EPA y DHA son altamente susceptibles a la oxidación debido al alto número de dobles enlaces reactivos. La fracción polar es altamente insaturada y al parecer la fosfatidilcolina es importante en la degradación de los lípidos del pescado (Takahashi et al. 1985). Los aceites se prestan a una fácil oxidación, pues se vuelven rancios durante la elaboración y el almacenamiento, esta oxidación se acelera por el calor, la luz y la presencia de catalizadores y pueden ser contrarrestada administrando antioxidantes, o almacenándolos en lugares oscuros (Cifuentes et al. 1997).

Por otra parte, el hecho de que a los 60 días la concentración de MDA haya sido menor que al inicio y que a los 30 de almacenamiento no precisamente indica que haya habido menor oxidación, lo más probable es que se hayan formado otros compuestos productos de la oxidación, diferentes al MDA y que por lo tanto no pudieron ser medidos a

través de la prueba de TBARS. Se sabe que durante la oxidación lipídica se generan los precursores del MDA (hidroxiperoxi epidioxidos, 1,3 dihidroxiperoxidos, 1,4 dihidroperoxido y los monohidroxiperoxidos) así como diversos compuestos que pueden reaccionar con el TBA por lo que los datos obtenidos con este método no son un reflejo exacto del grado de oxidación del sistema. Por lo tanto sería recomendable utilizar otras pruebas, además de la de TBARS, para conocer con mayor precisión el grado de oxidación en el huevo y poder identificar los compuestos que se oxidaron (Frankel y Neff, 1983; Guillen-Sanz y Guzmán-Chozas, 1998).

Utilizar el aceite de sardina con el fin de enriquecer al huevo con AGn3 es por el momento una alternativa no costosa, que debiera ser aprovechada en México por los avicultores (Gamez-Meza et al. 1999). Más aun cuando estudios realizados por Noriega et al (2002) han demostrado que el AS refinado, blanqueado, deodorizado y no deodorizado conserva el alto contenido de estos ácidos grasos.

Adicionar algas marinas a las dietas suplementadas con AS favoreció un mayor incremento de los AGn6 (principalmente del ácido linoleico) y de los AGn3 (principalmente del DHA), manteniendo de cualquier manera una relación n6:n3 adecuada. Esto indica que aunque las concentraciones de AGn3 en las algas son bajas en comparación con las de un aceite de pescado (por su bajo contenido de lípidos totales), son capaces de modificar el perfil lipídico en el huevo.

Por otra parte, el incremento en la concentración de AGn3 en el huevo al adicionar AM es de gran importancia en virtud de las recomendaciones que se han dado sobre su consumo a fin de reducir el riesgo de padecer enfermedades cardiovasculares y otros trastornos (Kris-Etherton et al. 2002; Holub, 2002).

Conclusión

Se concluye que utilizar el aceite de sardina en la dieta para gallinas es una alternativa para enriquecer el huevo con ácidos grasos omega 3 y reducir la relación n6:n3 en el mismo, lográndose mantener esta situación aun hasta por 60 días de almacenamiento a temperatura ambiente (20°C); y que adicionar algas marinas incrementa aun mas la concentración de AGn3 en el huevo, por lo que resulta conveniente suplementar la dieta

con AS y AM. El poder antioxidante de las algas no fue observado, por lo que se sugiere utilizar otras pruebas, además de la de TBARS, para medir el grado de oxidación cuando el huevo ha sido enriquecido con AGn3.

Referencias

- Al-Harhi MA, El-Deek AA (2012a) Effect of different dietary concentrations of Brown marine algae (*Sargassum dentifebium*) prepared by different methods on plasma and yolk lipid profiles, yolk total carotene and lutein plus zeaxanthin of laying hens. *Ital J Anim Sci*. 11(e64):347-353.
- Allen VG, Pond KR, Sakers KE, Fontenot JP, Bagley CP, Ivy RL, Evans RR, Schmidt RE, Fike JH, Zhang X, Ayad JY, Brown CP, Millar MF, Montgomery J, Mahan J, Wester DB, Melton C. 2001. Tasco: Influence of a brown seaweed on antioxidant in forages and livestock-A Review. *J Anim Sci* 79 (E Suppl): E21-E31.
- Anton M. 2007. Composition and structure of hen egg yolk. In: *Bioactive Egg Compounds*. Rainer Huopalahti, Rosina López-Fandiño, Marc Anton and Rüdiger Schade (editors), pp.1-6. Springer-Verlag Berlin Helderberg.
- Bailey AE. 1984. *Aceites y Grasas Industriales*. Segunda edición. Editorial Reverté. 675 pp.
- Bandarra N, Batista I, Nunes M, Empis J, and Christie W. 1997. Seasonal changes in lipid composition of Sardine (*Sardina pilchardus*). *J Food Sci* 62: 40-42.
- Bernal Gómez ME, De Mendonca-Junior CX, Mancini-Filho J. 2003. Estabilidad oxidativa de huevos enriquecidos con ácidos grasos poliinsaturados omega 3, frente a antioxidantes naturales. *Rev Bras Cienc Farm* 39 (4):
- Bou R, Codony R, Tres A, Decker EA, Guardiola F. 2009. Dietary strategies to improve nutritional value, oxidative stability, and sensory properties of poultry products. *Critical Rev Food Sci Nutr* 49:800-822.
- Carrillo S, López E, Casas MM, Ávila E, Castillo RM, Carranco ME, Calvo C, Pérez-Gil F. 2008. Potential use of seaweeds in the laying hen ratio to improve the quality of n-3 fatty acid enriched eggs. *J Appl Phycol* 20:721-728.
- Castillo-Badillo C, Vázquez-Valladolid JL, González-Alcorta M, Morales-Barrera E, Castillo-Domínguez RM, Carrillo-Domínguez S. 2005. El aceite de atún como fuente de ácidos grasos w-3 en el huevo de gallina. *Grasas y Aceites* 56: 153-159.
- Chapman VJ, Chapman DJ. 1980. *Seaweeds and their Uses*. Chapman and Hall, Third edition, London.
- Cherian G. 2007. Omega-3 Fatty Acids. In: *Wild-Type Food in Health Promotion and Disease Prevention*. F.De Meester and R.R. Watson (Editors), pp. 169-176. Humana Press Inc. Totowa, NJ, USA.
- Chow CK. 2008. *Fatty Acids in Foods and their Health Implications*. Third edition. CRC Press, Boca Raton, Florida, USA. 1281 p.
- Cloughley J, Noble R, Speake B, Sparks N. 1997. Manipulation of docosahexaenoic (C22:6 n3) acid in the chicken's egg. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids* 57:222.
- Conchillo A, Valencia I, Puente A, Ansorena D, Astiasarán I. 2006. Componentes funcionales en aceites de pescado y de alga. *Nutr Hosp* 21 (3): 369-373.
- Cornejo S, Hidalgo H, Araya J, Pokniak J. 2008. Suplementación de dietas de gallinas de postura comercial con aceites de pescado de diferentes grados de refinación. Efectos productivos en las aves y en la calidad organoléptica de los huevos. *Arch Med Vet* 40: 45-50.
- Crespo N, Esteve GE. 2001. Dietary fatty acid profile modify abdominal fat deposition in broiler chickens. *Poultry Science* 80(1): 71-78.
- Cuppert S, Schnepf M, Hall CIII. 1997. Natural Antioxidants-Are They a Reality? In: Shahidi F. Ed. *Natural antioxidants: Chemistry, health, effects and applications*. AOACS Press, Champaign, USA. pp 12-19.

- Dupont J.I. 1999. Fats and Oils. Nutritional Value. In: Encyclopedia of Human Nutrition. M.J Sadler, J.J Strain and B. Caballero (eds). Academic Press. London. pp719-729.
- El Gamal AA. 2010. Biological importance of marine algae. Saudi Pharmaceutical J. 18:1-25.
- Eskin NAM, Robinson DS. 2001. Food Shelf Life Stability. Chemical, Biochemical, and Microbiological changes. CRC Press, Boca Raton, Florida, USA, 370 pp.
- Eskin NAM, Przybylski R. 2001. Antioxidants and shelf life of foods. In: Food Shelf Life Stability. Chemical, Biochemical, and Microbiological Changes. N.A.Michael Eskin and David S. Robinson (Eds). Pp.175-209.
- Fisher C. 1984. Fat deposition in broilers. In: Fats in animal nutrition. J. Wiseman (ed). London, Butterworths. Pp 437-470.
- Freile PY. 2001. Algas en la botica. Avance y Desarrollo 20:283-292.
- García C, Albalá C. 1998. Composición lipídica de huevos de gallinas alimentadas con productos grasos y proteicos marinos. Arch Lat Nutr. 48:71-76.
- Goodrow EF, Wilson TA, Houde SC, Vishwanathan R, Scollin PA, Handelman G, Nicolosi RJ. 2006. Consumption of one egg per day increases serum lutein and zeaxanthin concentrations in older adults without altering serum lipid and lipoprotein cholesterol concentrations. J Nutr. 136:2519-2524.
- González-Esquerra R, Leeson S. 2000. Effect of feeding hens regular or deodorized menhaden oil on production parameters, yolk fatty acid profile, and sensory evaluation of eggs. Poult Sci. 79: 1597-1602.
- González-Esquerra R, Leeson S. 2001. Alternatives for enrichment of eggs and chicken meat with omega-3 fatty acids. Can J Anim Sci. 81(3):295-305.
- González-Muñoz M, Bastida S, Jiménez O, Lorenzo de C, Vergara G, Sánchez-Muñiz F. 2009. The effect of dietary fat on the fatty acid composition and cholesterol content of the eggs from Hy-line and Warren hens. Grasas y Aceites 60: 350-359.
- Goodfellow J. 2000. Dietary supplementation in subjects with hypercholesterolemia. J Am Coll Cardiol 35:265-270.
- Guérin-Dubiard C, Castellani O, Anton M. 2007. Egg compounds with antioxidant and mineral binding properties. In: Huopalahati R, López-Fandiño R, Anton M, Schade R (eds.), Bioactive Egg Compound,. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, 223-228.
- Guillén-Sans R, Guzmán-Chozas M. 1998. The thiobarbituric acid (TBA) reaction in foods: A Review. Crit Rev Food Sci Nutr 38(4):315-350.
- Halliwel B, Aeschbach R, Lolinger J and Aruoma OA. 1995. The characterization of antioxidants. Food Chem Toxic 33:601-617.
- Hargis PS, Van Elswyk ME, Hargis BM. 1991. Dietary modification of yolk lipid with menhaden oil. Poult Sci. 70:874-883.
- Hargis PS, Van Elswyk ME. 1993. Manipulating the fatty acid composition of poultry meat and eggs for the health conscious consumer. World's Poultry Sci J. 49:251-264.
- Herber-McNeill SM, Van Elswyk ME. 1996. Dietary marine algae promotes efficient deposition of n-3 fatty acids for the production of enriched shell eggs. Poul Sci. 75:1501-1507.
- Herber-McNeill SM, Van Elswyk ME. 1998. Dietary marine algae maintains egg consumer acceptability while enhancing yolk color. Poult Sci. 77:493-496.
- Hayat Z, Cherian G, Pasha TN, Khattak FM, Jabbar MA. 2010. Oxidative stability and lipid components of eggs from flax-fed hens: effect of dietary antioxidants and storage. Poult Sci. 89: 1285-1292.
- Huang YS, Liu JW. 1999. Fatty acids, Metabolism. In: Sadler M.J., Strain J.J. y Caballero B. (eds) Encyclopedia of Human Nutrition. Academic Press, London, pp 730-737.
- Jensen A. 1971. The nutritive value of seaweed meal for domestic animals. Proc. Seventh Int. Seaweed Symp. August, 1971. Sapporo, Japon. John Willey Sons. USA. Pp. 7-15.
- Jiménez-Escrig A, Goñi CI. 1999. Evaluación nutricional y efectos fisiológicos de macroalgas marinas comestibles. Arch Lat Nut 49(2):114-119.
- Kralik G, Gajcevic Z, Skrtic Z. 2008. The effect of different oil supplementations on laying performance and fatty acid composition of egg yolk. Ital J Anim Sci 7, 173-183.
- Kris-Etherton PM, Harris WS, Appel LJ. 2002. Fish consumption, fish oil, omega-3 fatty acids, and cardiovascular disease. Circulation 106:2747-2757.

- Lee JY, Hwang DH. 2008. Dietary fatty acids and eicosanoids. In: Fatty Acids in Foods and their Health Implications. Ching Kuang Chow (editor). pp.713-726. Third edition. CRC Press, Boca Raton, Fla, USA.
- Matanjan P, Mohamed S, Mustapha NM, Muhammad K, Ming CH. 2008. Antioxidant activities and phenolics content of eight species of seaweeds from north Borneo. *J Appl Phycol* 20:367-373.
- Matsukawa R, Dubinsky Z, Kishimoto E, Masakki K, Masuda Y. and Takeuchi T. 1997. A comparison of screening methods for antioxidant activity in seaweeds. *J. Appl. Phycol* 9:29-35.
- Maurice DV. 1994. Dietary fish oils. Feeding to produce designer eggs. *Feed Management* 45: 29-32.
- Nakamura T, Nagayakama K and Kawaguchi S. 1994. High tocopherol content in a brown alga *Ishige okamurae*. *Fish Sci.* 60:793-794.
- Nakamura T, Nagayakama K, Udrida K, Tanaka R. 1996. Antioxidant activity of phlorotannins from the brown alga *Eisenia bicyclis*. *Fish Sci.* 62:923-926.
- Qasim R, Barkati S. 1985. Ascorbic acid and dehydroascorbic acid contents of marine algal species from Karachi. *Pakistan J Sci Ind Res* 28: 129-133.
- Qi GH, Sim JS 1998. Natural tocopherol enrichment and its effect in n-3 fatty acid modified chicken eggs. *J Agric Food Chem* 46: 1920-1926.
- Ragan MA, Craig JS. 1973. Phenolic compounds in brown and red algae. In: Handbook of Phycological Methods. Physiological and biochemical methods. Edited by J.A. Hellebust & JS Craig. 157-179.
- Ramarathanam N, Osawa T, Ochi H, Kawakishis T. 1995. The contribution of plant food antioxidant to human health. *Trends Food Sci Tech.* 6:75-82.
- Rendón L.U., Carrillo D.S., Arellano M.L.G., Casas V.M.M., Pérez-Gil R.F., Avila G.E. 2003. Chemical composition of the residue of alginates (*Macrocystis pyrifera*) extraction. Its utilization in laying hens feeding. *Cuban J. Agric.Sci.* 37(3):287-293.
- Rice R. 1999. Fish Nutritional Value. In: Encyclopedia of Human Nutrition. MJ Sadler, JJ Strain, B Caballero (eds). Volume II. Pp. 793-803 pp. Academic Press.
- Rojkind AR de. 1977. Algas marinas bentónicas como suplemento en la alimentación animal. 1. Ensayos con pollos y gallinas ponedoras. Revisión bibliográfica. Centro de Investigación de Biología Marina. Estación Puerto Deseado, Estación Austral. Contribución técnica No. 19. Buenos Aires, Argentina. 23 pp.
- Sánchez-Machado DI, López-Cervantes J, López-Hernández J, Paseiro-Losada P. 2004. Fatty acids, total lipid, protein and ash contents of processed edible seaweeds. *Food Chem* 85:439-444.
- Šefer D, Andonov A, Šobajić S, Marković R, Radulović S, Jakić-Dimić D, Petrujkić B. 2011. Effects of feeding laying hens diets supplemented with omega 3 fatty acids on the egg fatty acid profile. *Biotech Anim Husb* 27(3):679-686.
- Seuss-Baum I. 2007. Nutritional evaluation of egg compounds. In: Bioactive Egg Compounds. Rainer Huopalahti, Rosina López-Fandiño, Marc Anton and Rüdiger Schade (editors), pp.117-140. Springer-Verlag Berlin Heidelberg.
- Simopoulos AP. 2008. The importance of the omega-6/omega-3 fatty acid ratio in cardiovascular disease and other chronic diseases. *Exp Biol Med* 233:674-688.
- Strand A, Herstad O, Liaaen-Jensen S. 1998. Fucoxanthin metabolites in egg yolks of laying hens. *Comp Biochem Physiol. Part A* 119 (4):963-974.
- Strain JJ, Benzie IFF. 1999. Antioxidants. Diet and antioxidant defence. In: MJ Sadler, JJ Strain, B. Caballero. Encyclopedia of Human Nutrition. Vol.I, pp. 95-120. Academic Press.
- Surai P. 2003. Natural antioxidants in avian nutrition and reproduction. Nottingham University Press, England, UK.
- Surai PF, MacPherson A, Speake BK, Sparks NHC. 2000. Designer egg evaluation in a controlled trial. *Eur J Clin Nutr* 54:298-305.
- Surai PF, Sparks NHC. 2001. Designer eggs: from improvement of egg composition to functional food. *Trends in Food Sci. Tech.* 12:7-16.
- Welch VA, Borlakoglu JT. 1982. Absorption and transport of dietary lipid: Effect on some lipid-related health problems. In: Fatty acids in foods and their health implications. Ed. By C. Kuang. Marcel Dekker, Inc. New York. pp: 559-612.
- Wheatley RA. 2000. Some trends and the analytical chemistry of lipid peroxidation. *Trends Anal Chem* 19(10): 617-628.

- Wiseman J, Salvador F, Craigon J. 1991. Prediction of the apparent metabolizable energy content of fats fed to broiler chickens. *Poult Sci* 70: 1527-1533.
- Yalcyn H, Unal MK, Basmacyoolu H. 2007. The fatty acid and cholesterol composition of enriched egg yolk lipids obtained by modifying hens diets with fish oil and flaxseed. *Grasas y Aceites* 58: 372-378.
- Yan X, Chuda Y, Susuki M, Nagata T. 1999. Fucoxanthin as the major antioxidant in *Hijikia fusiformis*, a common edible seaweed. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 63:605-607.
- Yannakopoulos A. 2007. Egg enrichment in omega-3 fatty acids. In: *Bioactive Egg Compounds*. Rainer H, R López-Fandiño, M Anton, R Schade (eds). Springer-Verlag Berlin Heidelberg, Pp 159-170.
- Yuan YV. 2008. Marine algal constituents. In: *Marine Nutraceuticals and Functional Foods*. C. Barrow and F. Shahidi (eds). pp 259-296. CRC Press, Boca Raton, Florida, USA.

6.4 Efecto sobre la composición en ácidos grasos, características sensoriales y estabilidad oxidativa del huevo al suplementar la dieta para gallinas con **aceite de sardina y ácido linoleico conjugado**

Efecto sobre la composición en ácidos grasos y estabilidad oxidativa del huevo almacenado a temperatura ambiente, al suplementar la dieta para gallinas con aceite de sardina y ácido linoleico conjugado

Resumen

Algunos investigadores han tratado de dar un doble valor agregado al huevo para plato, suplementando la dieta de las aves con aceite de pescado y ácido linoleico conjugado (CLA), enriqueciendo así al huevo con AGn3 y CLA, lo que aumenta el riesgo de una lipoperoxidación. Sin embargo, dado que el CLA posee propiedades antioxidantes, es posible que eso evite o reduzca dicho riesgo. El objetivo de este estudio es determinar el efecto que sobre la composición en ácidos grasos y la formación de malonaldehído (MDA) tiene el CLA en el huevo almacenado por 60 días a temperatura ambiente, al suplementar la dieta para las aves con aceite de sardina y CLA. Para ello se condujo un ensayo en el que se utilizaron 240 gallinas Bovans White de 75 semanas de edad, distribuidas en cuatro tratamientos con 5 réplicas de 12 aves cada una, constituyendo cada réplica la unidad experimental. A cada grupo de 60 gallinas le fue asignada aleatoriamente una de las siguientes dietas: T1-dieta base (DB), T2-DB+2.5%AS, T3-DB+2.5%AS+1%CLA, T4-DB+2.5%AS+2%CLA. El ensayo tuvo una duración de 4 semanas, con una semana previa de acostumbamiento. Agua y alimento fueron suministrados *ad libitum*. Al final del periodo experimental se midieron las variables productivas y el color de la yema. Se evaluó sensorialmente el sabor del huevo. La concentración de ácidos grasos (AG) en el huevo y el grado de oxidación de los mismos se midió a los 0, 30 y 60 días de almacenamiento a temperatura ambiente (20 C), mediante la prueba de TBARS. Los resultados mostraron un incremento notable en la concentración de AGS, de CLA y de los AGn3 ($P < 0.05$), y una reducción significativa de los AGM y del color de la yema ($P < 0.05$). La albumina presentó una coloración rosada. La concentración de malonaldehído (MDA) en el huevo fue significativamente más alta cuando las dietas estaban suplementadas con aceite de sardina + CLA. Se concluye que al suplementar la dieta de las gallinas con aceite de sardina y CLA se obtiene un huevo con doble valor agregado, pero el riesgo de oxidación es mayor.

Palabras clave: aceite de sardina, ácido linoleico conjugado, ácidos grasos omega 3, estabilidad oxidativa, huevo

Introducción

Actualmente las enfermedades cardiovasculares, la diabetes y diferentes tipos de cánceres se han convertido en las principales causas de mortalidad en muchos países de occidente. Sin embargo, se ha observado que consumir en forma regular ácidos grasos omega 3 (AGn3), particularmente el eicosapentaenoico (C20:5 EPA) y el docosahexaenoico (C22:6 DHA) resulta de ser de gran utilidad en la prevención y control de estas y otras enfermedades (Holub, 2002; Simopoulos, 2008). Pero también, el uso del ácido linoleico conjugado (CLA) ha cobrado un gran interés en virtud de los múltiples beneficios a la salud, que también ofrece. Se sabe que el CLA tiene efecto hipocolesterolémico, hipotriglicéridémico y antiaterogénico. En el sistema inmune ejerce una estimulación en la síntesis de la IgA, IgG, IgM y una disminución significativa en los niveles de IgE, por lo que se le considera potencialmente efectivo en la prevención y tratamiento de alergias alimentarias. Su acción sobre el cáncer mamario parece ser el más significativo, aunque también su participación en la reducción del peso corporal ha cobrado gran interés en los últimos años (Pariza y Ha, 1990; Ip, 1997; Sanhuenza et al. 2002; Aydin, 2005; Hur et al. 2007; Chow, 2008).

De ahí el interés de algunos investigadores por buscar ingredientes útiles para enriquecer con AGn3 y CLA alimentos de fácil consumo y bajo costo, como el huevo de gallina, dándole así un doble valor agregado (Cherian et al, 2002, 2007a; Alvarez et al. 2004; Carrillo et al. 2012). Los resultados que se han obtenido son muy interesantes, ya que con esa combinación no solo se ha logrado incrementar la concentración de CLA en el huevo, sino también la de los AGn3. Carrillo et al. (2012) realizaron un ensayo en el que proporcionaron a gallinas ponedoras cuatro diferentes dietas. Una era la dieta base o testigo, las otras tres estaban suplementadas con 2.5% de aceite de sardina (AS), pero dos de ellas incluían además 1% ó 2% de CLA. Los resultados que obtuvieron mostraron un incremento significativo en el contenido de CLA (0.07 vs 2.98%), y de los ácidos eicosapentaenoico (C20:5 EPA) y docosahexaenoico (C22:6 DHA) cuando las dietas fueron suplementadas con AS (EPA 0.53% EPA y DHA 3.92% del total de ácidos grasos); en comparación con el grupo testigo (EPA 0.02% y DHA 0.77%). Pero más interesante aun, resultó el hecho de que estas concentraciones aumentaron todavía más cuando a las

dietas suplementadas con AS se les agregó 1% ó 2% de CLA (EPA 0.59%, DHA 4.31%) Estos resultados concuerdan con lo observado por otros autores, quienes señalan que el CLA favorece la síntesis y deposición del EPA y DHA en el huevo (Emken, 1984; Du et al. 2000; Cherian et al. 2002; Raes et al. 2002).

Esto plantea otro problema ya que se sabe que los ácidos grasos de cadena larga, son más susceptibles de oxidarse. Por lo tanto, al tener el huevo un mayor contenido de AGn3 y de CLA el riesgo de oxidación será mayor. Sin embargo, dado que el CLA tiene otra propiedad muy importante, la de antioxidante, es posible que esto contribuya a reducir el riesgo de una lipoperoxidación. De hecho, algunos autores señalan que es mas potente que el alfa-tocoferol y aun mas efectivo que el hidroxitolueno (BHT) (Ha et al. 1990; Hur et al. 2007). La información al respecto no es contundente, sin embargo, en modelos in vivo el CLA produce una disminución significativa en los niveles de peróxidos y de sustancias reactivas al ácido tiobarbiturico. Estudios in vitro han demostrado que el CLA posee una efectiva capacidad para atrapar radicales libres, por lo que se considera un potente antioxidante (Banni et al. 1998).

Por lo tanto, el objetivo de este estudio fue determinar el efecto que sobre la composición en ácidos grasos y la formación de malonaldehido (MDA) en el huevo almacenado durante 60 días a temperatura ambiente (20 C) tiene el CLA, al ser incorporado en dietas para gallinas suplementadas con aceite de sardina.

Materiales y Métodos

Obtención del aceite de pescado y del CLA

El aceite de sardina (AS) empleado en el estudio provenía de Guaymas, Sonora, México, de una planta procesadora de harinas de pescado, no estaba deodorizado, refinado ni blanqueado y estaba estabilizado con 200 ppm de butilhidroxitolueno (BHT), como antioxidante. Se mantuvo en refrigeración y en oscuridad hasta el momento de ser utilizado La presentación comercial del ácido linoleico conjugado (CLA) utilizado en este estudio, contenía 20% de CLA (10% del isomero c9, t11 y 10% del isomero t10, c12) (Lutrell^R Pure granulado, BASF Mexicana).

Formulación y preparación de las dietas

La dieta base se formuló con el programa Nutrion Windows TM (Versión 5.0 Pro), cubriendo las necesidades nutrimentales establecidas por el National Research Council (NRC 1994) para gallinas ponedoras, con 15% de proteína cruda y 2785 kcal de energía metabolizable. Fue elaborada con base sorgo-soya y sin antioxidante (Cuadro 19). Esta dieta fungió como testigo (T1), mientras que las otras tres dietas experimentales fueron suplementadas con 2.5% AS, en sustitución del aceite de soya; pero a dos de ellas se les adicionó además 1% ó 2% de ácido linoleico conjugado (CLA) (T2, T3 y T4 respectivamente).

Las dietas se prepararon cada semana, primero en una mezcladora de gusano sinfín con capacidad para 120 kg/5 minutos, y posteriormente en una mezcladora de listón (Howes Co Inc model 152 M) por 3 minutos a 75 rpm.

Análisis de la composición de ácidos grasos en los aceites y dietas

En el caso de las dietas y de los aceites, previo al análisis de ácidos grasos, se hizo una extracción de lípidos con cloroformo:etanol (1:1) (AOAC 2000, método 923.07). El extracto lipídico de las dietas y de los aceites, fue metilado con trifluoruro de boro al 20% en una solución metanólica al 2% (AOAC 2000, método 969.33). Las muestras se inyectaron en un cromatógrafo de gases Varian, modelo 3380 CX equipado con un automuestreador CP8400, detector de ionización de flama y columna DB23 de 30 m con un d.i. de 0.25mm. Se utilizó al nitrógeno como gas acarreador a un flujo de 30 mL/min. Las temperaturas utilizadas fueron: columna 230°C, inyector 150°C, detector 300°C. Para calcular la concentración de ácidos grasos se utilizó como patrón de referencia una mezcla de estándares de ácidos grasos con concentraciones conocidas (SupelcoTM 37 FAME Mix SIGMA). El ácido miristoleico fue utilizado como estándar interno. La integración de los resultados se hizo mediante el programa Star Chromatography Workstation vs 6.3 Varian Associates, Inc. Los resultados se reportan en porcentaje del total de ácidos grasos (%TAG) (Cuadros 20 y 21).

Cuadro 19. Composición porcentual de la dieta base

Ingrediente	kg
Sorgo grano	61.8
Pasta de soya	20.4
Carbonato de calcio	12.4
Aceite de soya	2.50
Ortofosfato 1820 ¹	1.55
Sal (NaCl)	0.45
L-Lisina HCL	0.35
Avelut polvo 15 ²	0.10
Toxisorb	0.10
Alimet 88%	0.08
Avired ³	0.08
Premezcla mineral ⁴	0.05
Cloruro de colina 60	0.05
Premezcla vitamínica ⁵	0.05
Bacitracina	0.03
L-treonina	0.03
Antioxidante	0.00
Total	100.02
Aporte calculado	
Energía Metabolizable (Mcal/kg)	2.75
Proteína cruda %	15.32
Metionina %	0.33
Met + Cis %	0.58
Lisina %	1.02
Treonina	0.63
Calcio total %	4.85
Fósforo disponible %	0.41
Sodio %	0.18
Cloro %	0.40
Colina mg/kg	1260.69

¹ Fosfato monobásico P 21% min, Ca 18% min, F 0.21% max, humedad 5% max.

² Fuente natural de xantófilas amarillas (Flor de cempasúchitl) 15 g/kg

³ Pigmento vegetal rojo: Lucantin Red como fuente de cantaxantina, 5 g carotenoides total /kg

⁴ Minerales (mg/kg dieta): Mn 120; Zn 100; Fe 120; Cu 12; I 0.7; Se 0.4; Co 0.2; excipiente, c.b.p. 1 000

⁵ Vitaminas (por kg): A, 10 000 000 IU; D₃, 3 000 000 IU; E, 20 000 IU; K₃, 2.500 g; Tiamina, 2.500 g; Riboflavina, 5 g; Niacina, 35 g; Acido pantoténico, 10 g; Piridoxina, 4 g; Acido fólico, 1 g; Cianocobalamina, 10 mg; Biotina, 200 mg; excipiente cbp 1 000.

Cuadro 20. Composición en ácidos grasos de los aceites

Acido graso (% total de ácidos grasos)	Aceite de soya	Aceite de sardina
Mirístico (C14:0)	0.11	6.09
Palmítico (C16:0)	10.77	18.54
Heptadecanoico (C17:0)	0.10	0.56
Esteárico (C18:0)	4.22	3.82
Araquídico (C20:0)	0.31	0.29
Total AGS	15.58	29.42
Pentadecanoico (C15:1)	0.00	0.51
Palmitoleico (C16:1)	0.18	7.47
cis10-heptadecenoico (C17:1)	0.07	0.99
Oleico (C18:1)	21.91	12.2
cis-vaccénico (C18:1)	0.83	3.06
Eicosenoico (C20:1)	0.22	0.22
Erúxico (C22:1)	0.05	0.22
Total AGM	23.33	24.91
Linoleico (C18:2 n6)	53.23	1.37
CLA c9,t11 y c11,t9 (C18:2)	0.03	2.55
CLA t10,c12 (C18:2)	nd	0.29
γ-linolénico (C18:3 n6)	0.06	0.31
α-linolénico (C18:3 n3)	6.95	0.99
cis-11,14-eicosadienoico (C20:2)	0.05	0.25
cis-11,14,17eicosatrienoico (C20:3)	0.10	0.18
cis-8,11,14-eicatrienoico (C20:3)	nd	0.22
Araquidónico (C20:4 n6)	nd	0.75
Eicosapentaenoico (C20:5 n3)	0.40	14.2
Docosapentaenoico (C22:5 n3)	nd	1.57
Docosapentaenoico (C22:5 n6)	nd	nd
Docosahexaenoico (C22:6 n3)	0.04	10.26
Total AGPI	60.90	32.94
Total n6	53.29	2.43
Total n3	7.39	27.02
n6:n3	7.21	0.09

AGS-ácidos grasos saturados, AGM-ácidos grasos monoinsaturados, AGPI-ácidos grasos poliinsaturados

Cuadro 21. Composición en ácidos grasos de las dietas experimentales

Acidos grasos (% total ácidos grasos)	T1	T2	T3	T4
Laurico (C12:0)	0.13	0.1	0.08	0.06
Mirístico (C14:0)	0.24	3.46	2.42	1.66
Palmítico (C16:0)	13.03	17.01	14.58	13.48
Heptadecanoico (C17:0)	0.12	0.35	0.28	0.25
Esteárico (C18:0)	3.86	3.27	13.07	22.69
Araquídico (C20:0)	0.26	0.22	0.53	0.62
Lignocérico (C24:0)	0.12	0.08	0.12	0.12
Total AGS	17.93	24.64	31.08	38.88
Pentadecanoico (C15:1)	0.04	0.31	0.22	0.16
cis10-pentadecenoico (C15:1)	0.07	0.05	0	0.06
Palmitelaídico (C16:1)	0.08	0.1	0	0.07
Palmitoleico (C16:1)	0.44	4.11	2.67	1.89
cis10-heptadecenoico (C17:1)	0.07	0.29	0.34	0.24
Oleico (C18:1 n9)	27.78	20.41	18.87	17.22
cis-vaccénico (C18:1)	0.72	2.23	1.61	1.2
Eicosenoico (C20:1)	0.28	1.32	0.92	0.65
Erucico (C22:1)	0.11	0.16	0.63	0.39
Total AGM	29.58	28.97	25.26	21.87
Linoléico (C18:2 n6 LA)	43.71	20.36	13.55	9.47
Gama-linolénico (C18:3 n6 GLA)	0	0.14	0.08	0.05
Alfa-linolénico (C18:3 n3 ALA)	4.54	1.6	1.05	0.69
CLA c9,t11 y c11,t9 (C18:2)	0	0.45	5.45	9.58
CLA t10,c12 (C18:2)	0	0	5.36	10.72
cis-11,14-eicosadienoico (C20:2)	0.04	0.11	0.08	0.05
cis-11,14,17eicosatrienoico (C20:3)	0.04	0.06	0	0.04
cis-8,11,14-eicatrienoico (C20:3)	0.04	0.23	0	0.12
Araquidónico (C20:4 n6 AA)	0.19	0.45	0.25	0.18
Eicosapentaenoico (C20:5 n3 EPA)	0.3	8.05	5.45	3.77
Docosapentaenoico (C22:5 n6 DPA)	0	0.16	0.11	0.07
Docosapentaenoico (C22:5 n3 DPA)	0	1.08	0.7	0.46
Docosahexaenoico (C22:6 n3 DHA)	0.07	6.11	3.89	2.57
Total AGPI	48.93	39.94	40.51	37.35
Total CLA	0	1.42	15.22	19.8
Total AGn6	43.9	21.12	13.99	9.77
Total AGn3	4.91	16.83	11.1	7.49
n6:n3	9:01	1.3:1	1.3:1	1.3:1

T1-Dieta base (DB), T2-DB+2.5%AS, T3-DB+2.5%AS+1%CLA, T4-DB+2.5%AS+2%CLA

AGS-ácidos grasos saturados, AGM-ácidos grasos monoinsaturados, AGPI-ácidos grasos poliinsaturados

Medición de las variables productivas

El ensayo experimental con las aves tuvo lugar en el Centro Experimental de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia (UNAM), ubicado en Santiago, Zapotitlán, Delegación Tlahuac, Distrito Federal. El clima de la región es templado subhúmedo, con una precipitación anual de 747 mm, siendo enero el mes mas frío y mayo el más caluroso. Para cada tratamiento se utilizaron 60 gallinas Bovans White de 75 semanas de edad, con 5 réplicas de 12 aves cada una, constituyendo cada réplica la unidad experimental. A cada grupo de gallinas le fue asignada aleatoriamente una de las dietas experimentales. El ensayo tuvo una duración de 4 semanas, con una semana previa de acostumbramiento y un programa de 16 horas de luz. Agua y alimento fueron suministrados *ad libitum*. Se llevó un registro diario del consumo de alimento, producción de huevo y peso del huevo. Al final de cada semana se hizo un resumen semanal de las variables antes mencionadas, así como, de la masa de huevo y conversión alimenticia.

El estudio se condujo en conformidad con las políticas establecidas por el Comité de Ética para el Cuidado de los Animales, de la Fac.Med.Vet.Zoot., UNAM.

Evaluación del color de la yema con el Abanico Roche

Al final de la cuarta semana de experimentación se tomaron al azar 25 huevos de cada tratamiento (5 por réplica) para medir el color de la yema, de acuerdo a los valores del abanico colorimétrico Roche, cuyos valores van del 1 al 15, correspondiendo el número 1 a un color amarillo muy pálido y el 15 a un amarillo-naranja muy intenso.

Evaluación sensorial del huevo

Al final de las cuatro semanas de experimentación, se realizó una prueba de evaluación sensorial en cabinas individuales en el Laboratorio de Evaluación Sensorial del Depto. de Ciencia y Tecnología de los Alimentos del INCMNSZ. Se aplicó una prueba afectiva para medir el grado de aceptación por el sabor del huevo y el color de la yema (Anzaldúa-Morales, 1994). En los dos casos se utilizó una escala ordinal de cinco puntos. Participaron 30 jueces no entrenados, de ambos sexos, consumidores habituales de huevo.

a) Sabor del huevo

De cada tratamiento se tomaron al azar 8 huevos, se revolvieron y frieron en una sartén con aceite en aerosol (PAM^{MR}). En ninguno de los casos se adicionó sal u otro sazonador. A cada tratamiento se le asignó una clave de tres dígitos, tomados de una tabla de números aleatorios (Meilgaard et al. 1999).

En una charola, se colocó un plato con las diferentes muestras de huevo revuelto, junto con una pieza de pan blanco y un vaso de agua (que entre muestra y muestra debería consumir el panelista a fin de eliminar sabores residuales) y un cuestionario para indicar el grado de aceptación para cada una de las muestras. Dentro de la cabina se utilizó luz roja para evitar que el panelista se dejará influir por el color del huevo al evaluar el sabor del mismo.

b) Color de la yema

Se tomó un huevo de cada tratamiento, cada yema se colocó en recipientes de plástico transparente sobre un fondo blanco, asignando a cada yema una clave de tres dígitos (diferente a la empleada en la evaluación del sabor), tomados de una tabla de números aleatorios (Meilgaard et al. 1999).

A cada panelista se le entregaba una charola con las yemas de los diferentes tratamientos a evaluar. Junto con ello se les daba un cuestionario donde indicaban el grado de aceptación por el color de la yema de cada tratamiento, de acuerdo a la escala de cinco puntos que ahí se señalaban. Dentro de la cabina se utilizó luz blanca.

Se cerró la ventanilla de la cabina (para permitir la concentración del panelista) y se esperó la señal (luz de color rojo) que indicaba que había concluido su evaluación. En ese momento se abría la ventanilla para recoger los cuestionarios.

Análisis de la composición en ácidos grasos del huevo

Al final de la cuarta semana de experimentación se tomaron al azar 30 huevos de cada tratamiento (6 por réplica). 10 de ellos se mezclaron con una batidora para formar un “pool”, de allí se tomaron 10 alícuotas de 1 g para realizar la extracción lipídica con cloroformo:etanol (1:1) (AOAC 2000, método 923.07) y metilar los ácidos grasos con trifluoruro de boro al 20% en una solución metanólica al 2% (AOAC 2000, método

969.33). Las 20 piezas restantes de cada tratamiento, se conservaron a temperatura ambiente (20°C), para efectuar estos mismos análisis a los 30 y 60 días siguientes. Las muestras se inyectaron en un cromatógrafo de gases Varian, modelo 3380 CX equipado con un automuestreador CP8400, detector de ionización de flama y columna DB23 de 30 m con un d.i. de 0.25mm.

Determinación de la oxidación lipídica mediante la prueba de TBARS

En la cuarta semana de experimentación se tomaron de cada tratamiento 30 huevos. Al siguiente día, después de la recolección, a 10 de ellos se les determinó el grado de oxidación lipídica en yema, utilizando el método del ácido tiobarbitúrico (TBARS) (Salih et al. 1987; Botsoglou et al.1994). Las 20 piezas restantes se conservaron a temperatura ambiente (20°C), para efectuar el mismo análisis (n=10) a los 30 y 60 días siguientes.

Diseño Experimental del Estudio

El estudio fue prospectivo, comparativo y experimental. El modelo estadístico utilizado para las variables productivas y el color de la yema fue conforme a un diseño completamente al azar, siendo el siguiente:

$$Y_{ij} = \mu + T_i + \xi_{ij} \quad \text{donde:}$$

Y_{ij} = Valor de la variable de respuesta en el tratamiento i , repetición j .

μ = media general

T_i = Efecto del tratamiento i .

ξ_{ij} = Error experimental del i -ésimo tratamiento de la j -ésima repetición.

El diseño empleado para la concentración de lípidos totales, ácidos grasos y malonaldehído (MDA) en el huevo, fue uno completamente al azar, con arreglo factorial 2x3, donde los factores a considerar fueron la dieta (testigo y experimental) y el tiempo de conservación del huevo (0, 30 y 60 d) a temperatura ambiente. El modelo estadístico asociado a este diseño fue el siguiente:

$$Y_{ijk} = \mu + A_i + B_j + A_i*B_j + \xi_{ijk}$$

donde:

Y_{ijk} = Variable de respuesta debido al efecto de la dieta y el tiempo de conservación

μ = media general

A_i = Efecto de la i -ésima dieta

B_j = Efecto del j -ésimo tiempo de conservación

$A_i * B_j$ = Interacción entre la dieta y el tiempo de conservación

ξ_{ij} = Error experimental del i -ésimo tratamiento de la j -ésima repetición.

Análisis estadístico

Los datos de las variables productivas y el color de la yema (medido con el abanico Roche) se analizaron mediante un análisis de varianza para un diseño completamente al azar, y contrastes ortogonales para la comparación de medias se utilizó la prueba de Tukey ($P < 0.05$) (SAS, 2008).

Los datos obtenidos en la prueba de evaluación sensorial se analizaron mediante la prueba no paramétrica de rangos de Wilcoxon con una significancia de 0.05 (SAS, 2008).

Los datos de las variables concentración de lípidos totales, ácidos grasos y MDA en huevo se analizaron conforme a un diseño completamente al azar con arreglo factorial 2x3, siendo un factor la dieta y el otro el tiempo. Se utilizó el PROC GLM de SAS (SAS, 2008) para el análisis de los datos. La comparación entre medias se hizo con la prueba de Tukey ($P < 0.05$).

Resultados

Variables productivas

Los resultados mostraron que al suplementar la dieta con AS se afectaron en forma negativa la producción y masa de huevo, disminuyendo en forma considerable, pero el color de la yema se vio favorecido, ya que pasó de un valor de 9 a 10 del abanico Roche ($P < 0.05$). El consumo de alimento y peso del huevo no se vieron afectados (Cuadro 22).

Sin embargo, cuando el AS se suministró junto con el CLA, cambios aún más significativos fueron observados en estas variables y en la calidad física del huevo ($P < 0.05$). Por un lado, el consumo de alimento disminuyó significativamente cuando se adicionó 2% de CLA a dietas suplementadas con AS ($P < 0.05$). La producción, peso y masa del huevo se redujeron notablemente cuando 1% y 2% de CLA fueron adicionados a las dietas ($P <$

0.05). La conversión alimenticia al igual que la coloración de la yema, se vieron afectados en forma negativa con ambos niveles de inclusión de CLA ($P < 0.05$), aunque con 2%, en particular, el color de la yema fue todavía menor (Cuadro 22).

Cuadro 22. Variables productivas y color de yema obtenidos al suplementar la dieta para gallinas ponedoras con aceite de sardina y ácido linoleico conjugado en forma combinada

	T1	T2	T3	T4
Consumo de alimento (g/ave/d)	115.00 ± 7.13 a	110.85 ± 10.26 ba	111.53 ± 6.28 ba	107.61 ± 6.18 b
Producción de huevo (%)	84.31 ± 7.52 a	77.28 ± 7.64 b	77.50 ± 7.66 b	76.31 ± 6.48 b
Peso de huevo (g)	67.25 ± 1.78 a	66.64 ± 4.33 a	62.37 ± 2.74 b	62.41 ± 1.88 b
Masa de huevo (g)	56.77 ± 6.07 a	51.60 ± 6.84 b	48.32 ± 5.04 b	47.63 ± 4.81 b
Conversión alimenticia	2.06 ± 0.22 b	2.28 ± 0.41 ba	2.34 ± 0.21 a	2.28 ± 0.24 ba
Color de yema	8.74 ± 1.11 cb	9.60 ± 0.49 a	9.08 ± 0.48 b	8.54 ± 0.73 c

a, b, c En cada renglón, literales distintas indican diferencia estadística ($P \leq 0.05$)

T1- dieta base (DB), T2- DB+AS, T3- DB+AS+1%CLA, T4-DB+AS+2%CLA

Evaluación sensorial

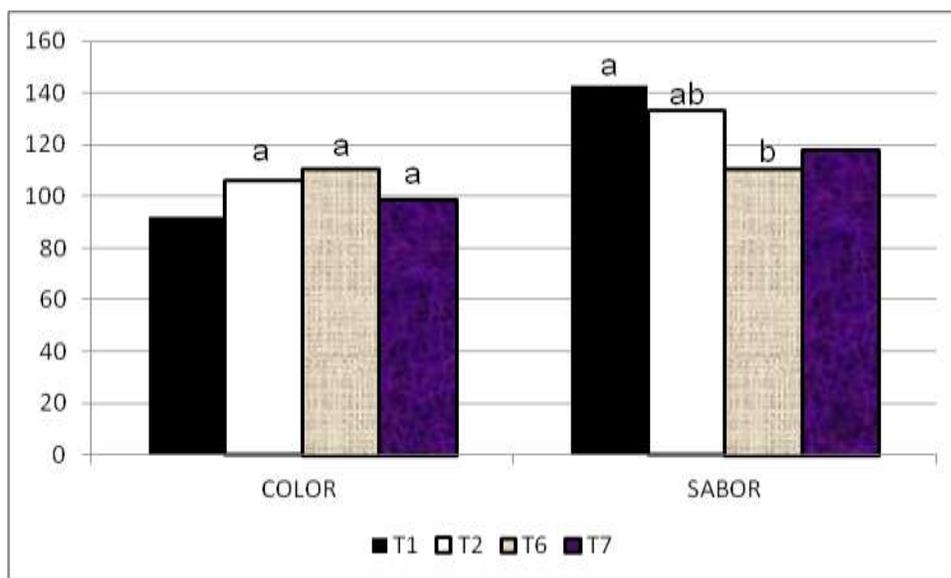
La aceptación por el color de la yema no fue diferente entre los cuatro tratamientos ($P > 0.05$). Respecto al sabor, solo el huevo del T3 (DB+AS+1%CLA) tuvo una menor aceptación que el huevo del T1 ($P < 0.05$), con los otros tratamientos las diferencias no fueron significativas ($P > 0.05$) (Figura 17).

Lípidos totales y ácidos grasos en el huevo

El contenido de lípidos en el huevo se mantuvo constante a lo largo de los 60 días en los tratamientos T1(DT) y T2(DT+AS), pero en T6 (DT+AS+1%CLA) hubo un menor contenido en el día 0 y 60, mientras que en T7 (DT+AS+2%CLA) lo fue en el día 60 ($P < 0.05$) (Cuadro 23).

Al suplementar la dieta con AS la concentración total de AGS se incrementó aproximadamente un 5%; sin embargo cuando se adicionó CLA, el incremento fue de hasta 56% en el T3 y 62% en T4. La concentración de AGS en el huevo se mantuvo constante a lo largo de los 60 d, en los tratamientos T1 y T2 ($P > 0.05$). Pero en los que tenían CLA no solo aumentó significativamente ($P < 0.05$) la concentración de los ácidos mirístico (C14:0), palmítico (C16:0)(mas del 50%) y esteárico (C18:0) (mas de un 100%) en el huevo, con respecto a los otros tratamientos; sino que también hubo cambios por efecto del tiempo de

conservación. Por ejemplo, con 1%CLA la concentración del ácido palmítico se redujo a los 30 y 60 d, mientras que con 2%CLA la presencia del ácido esteárico se redujo a los 60 d de conservación ($P < 0.05$) (Cuadro 23).



^{a,b} En cada variable, literales distintas indican diferencia estadística ($P < 0.05$)

T1- dieta base (DB), T2- DB+AS, T6- DBAS+1%CLA, T7-DB+AS+2%CLA

Figura 17. Aceptación por el color de la yema y sabor del huevo cuando se incorporó CLA a la dieta suplementada con aceite de sardina (total de puntos)

Asimismo, cuando la dieta se suplementó con AS la concentración total de AGM se incrementó un 3%, sin embargo, cuando se adicionó CLA a estas dietas, ocurrió lo contrario que con los AGS, la concentración de los ácidos palmitoleico, cis-vaccénico y oleico se redujo notablemente, habiendo en consecuencia un decremento significativo en el total de AGM de 59% en el T6 y de 51% en T7, con respecto al T1 ($P < 0.05$).

En cuanto a la concentración total de los AGPI en el huevo, se observó que al suplementar la dieta con AS, hubo una reducción de 26% con respecto a la DT ($P < 0.05$), siendo esta reducción principalmente en los ácidos linoleico, α -linolénico y araquidónico. Pero por otra parte, hubo un incremento significativo en la concentración de los AGn3, eicosapentaenoico, docosapentaenoico y docosahexaenoico ($P < 0.05$), de hecho en el caso de este último, el incremento fue de 370%. La relación n6:n3 pasó de 11:1 a 2:1 ($P < 0.05$).

Al adicionar CLA a dietas suplementadas con AS, la concentración del ácido linoleico se redujo aun mas que en T2 (DT+AS), donde la reducción fue de 41%. En el caso del T6 este ácido graso se redujo 46% y en el T7 la reducción fue de 50%. Por otra parte, la presencia del ácido linoleico conjugado (CLA) y la de los AGn3, EPA (C20:5), DPA (C22:5) y DHA (C22:6) se incrementó significativamente en el huevo ($P<0.05$). El incremento en el total de AGn3, con respecto a T1 fue de 266% en T2, 414% en T6 y de 401% en T7 ($P<0.05$). La relación n6:n3 en el huevo se redujo aun mas con respecto al T1(11:1) y T2 (2:1), pasando a ser de 1:1 en los tratamientos con CLA (Cuadro 23).

La concentración total de CLA en el huevo fue proporcional a la cantidad de CLA adicionada en las dietas. Y aún cuando en las dietas de ambos tratamientos la proporción de los isómeros de CLA, c9t11 y t10c12, era igual, en la yema predominó el cis 9 trans 11 (Cuadro 23).

Cuadro 23. Contenido de lípidos totales (g/100g)¹ y ácidos grasos (%TAG)² en el huevo conservado durante varios días a temperatura ambiente al suplementar la dieta para gallinas ponedoras con aceite de sardina y CLA en forma combinada

	T1			T2			T3			T4		
	0	30	60	0	30	60	0	30	60	0	30	60
Lípidos totales	11.74 ba	11.49 bac	11.34 bc	11.41 bc	11.58 ba	11.60 ba	9.41 e	11.54 bac	10.69 dc	11.96 ba	12.27 a	10.43 d
Mirístico (C14:0)	0.34 f	0.38 f	0.35 f	0.48 e	0.54 d	0.52 ed	0.68 b	0.63 c	0.72 a	0.60 c	0.61 c	0.67 b
Palmitico (C16:0)	24.62 f	24.88 f	24.89 f	26.90 d	26.40 e	26.06 e	32.45 a	31.69 b	31.65 cb	31.59 cb	31.58 cb	31.31 c
Esteárico (C18:0)	8.57 fe	8.88 e	8.45 fe	7.95 g	8.31 fg	8.22 fg	19.23 d	20.56 c	20.25 c	22.20 b	22.84 a	20.44 c
Total AGS	33.53 d	34.14 d	33.69 d	35.34 c	35.25 c	34.80 c	52.36 b	52.88 b	52.62 b	54.39 a	55.03 a	52.41 b
Palmitoleico (C16:1)	2.33 e	2.34 e	2.55 d	3.61 a	3.31 c	3.40 b	1.35 f	1.22 g	1.31 f	0.95 i	0.95 i	1.05 h
Cis-vaccénico (C18:1)	1.57 bc	1.50 c	1.47 c	1.87 a	1.71 ba	1.80 a	0.42 ed	0.30 e	0.55 d	0.28 e	0.31 e	0.53 d
Oleico (C18:1)	40.9 b	40.93 b	42.15 a	42.66 a	42.63 a	42.64 a	24.56 c	24.25 c	22.64 d	21.50 e	21.23 e	21.86 e
Total AGM	44.8 c	44.77 c	46.17 b	48.14 a	47.65 a	47.83 a	26.33 d	25.77 d	24.50 d	22.74 gf	22.50 g	23.43 f
Linoleico (C18:2 LA)	15.95 a	16.03 a	13.90 b	9.46 c	9.85 c	9.52 c	8.52 d	8.30 ed	8.23 ed	7.92 e	7.21 f	8.33 ed
CLA c9, t11	0.05 hg	0.00 h	0.06 hg	0.07 hg	0.08 g	0.08 g	2.26 e	2.15 f	2.43 d	3.74 b	3.60 c	4.02 a
CLA t10, c12	0.02 f	0.00 f	0.00 f	0.12 e	0.12 e	0.13 e	1.01 d	0.99 d	1.17 c	1.74 b	1.71 b	1.86 a
γ-linolénico (C18:3 GLA)	0.13 b	0.15 a	0.04 f	0.06 c	0.05 dce	0.05 fe	0.05 dce	0.06 dc	0.05 dfe	0.05 dfe	0.05 dfe	0.05 fe
α-linolénico (C18:3 ALA)	0.65 a	0.67 a	0.52 b	0.37 dc	0.38 c	0.37 dc	0.35 dce	0.31 fe	0.34 dce	0.32 dce	0.27 f	0.32 dce
Araquidónico (C20:4 AA)	1.82 b	1.80 b	1.90 a	0.65 dc	0.63 d	0.71 c	0.53 fe	0.53 fe	0.58 de	0.47 f	0.53 f	0.49 f
Eicosapentaenoico (C20:5 EPA)	0.00 g	0.04 f	0.02 gf	0.41 e	0.39 e	0.53d	0.59 c	0.67 b	0.73 a	0.59 c	0.62 c	0.59 c
Docosapentaenoico (C22:5 DPA n6)	0.33 a	0.31 b	0.35 a	0.03 e	0.00 f	0.03 de	0.06 c	0.05 dc	0.06 c	0.05 dce	0.06 c	0.05 dce
Docosapentaenoico (C22:5 DPA)	0.11 h	0.11 h	0.12 h	0.35 g	0.38 gf	0.39 f	1.20 d	1.23 d	1.44 a	1.36 b	1.29 c	1.15 e
Docosahexaenoico (C22:6 DHA)	0.84 e	0.85 e	0.92 e	3.12 d	3.08 d	3.26 d	4.48 ba	4.53 a	4.58 a	4.15 c	4.21 bc	4.08 c
Total AGPI	19.91 cb	19.95 cb	17.82 f	14.65 g	14.96 g	15.06 g	19.05 ed	18.82 e	19.60 c	20.38 b	19.53 cd	20.93 a
Total CLA	0.07 h	0.00 h	0.06 h	0.19 g	0.20 g	0.21 g	3.28 e	3.14 f	3.60 d	5.47 b	5.31 c	5.88 a
Total n6	18.24 a	18.29 a	16.18 b	10.20 c	10.53 c	10.30 c	9.16 d	8.94 d	8.92 d	8.49 e	7.85 f	8.92 d
Total n3	1.60 g	1.66 g	1.59 g	4.26 fe	4.23 f	4.55 e	6.62 cb	6.74 b	7.09 a	6.42 cbd	6.39 cd	6.14 cd
n6:n3	11.41 a	11.03 a	10.20 b	2.42 c	2.50 c	2.27 c	1.39 d	1.33 d	1.26 d	1.32 d	1.23 d	1.46 d

¹ en 100 g de huevo completo (yema+clara), ² TAG=total de ácidos grasos a, b, c, d,e,f,g En cada renglón, literales distintas indican diferencia estadística (P≤ 0.05).

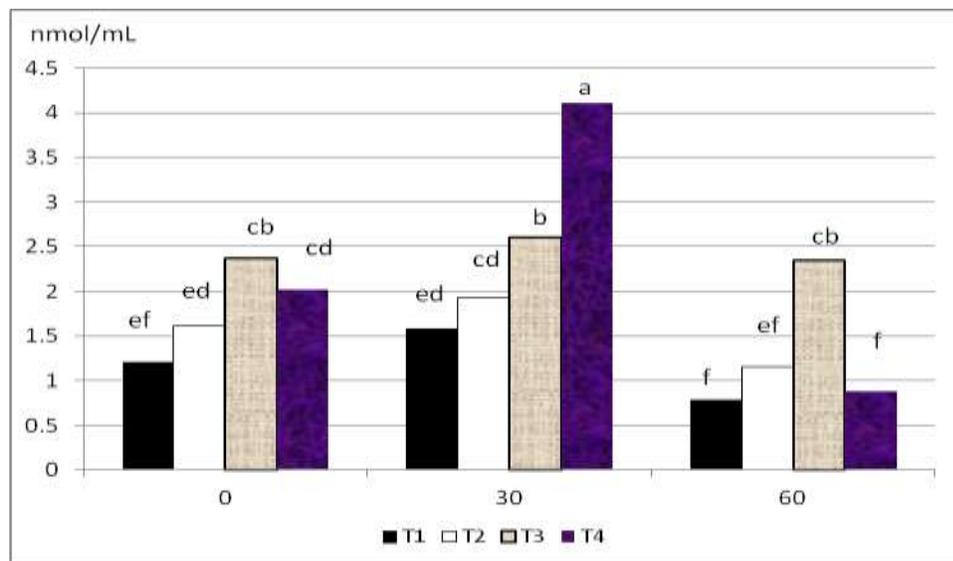
En general, se observó que suplementar las dietas con AS+CLA incrementó significativamente la cantidad de AGS en el huevo y la de los AGn3, EPA, DPA y DHA; mientras que la concentración de los AGM se redujo notablemente ($P < 0.05$). El tiempo de conservación, en general no tuvo un efecto significativo sobre la concentración de AG, salvo algunas excepciones, como en el caso del T4 (DT+AS+2%CLA) donde la concentración de ácido esteárico en el huevo se redujo significativamente a los 60 días de conservación, lo mismo ocurrió en el T1 con el ácido linoleico ($P < 0.05$).

Malondialdehido (MDA) en yema

Los resultados obtenidos mostraron que desde el primer día de conservación se empezó a formar MDA en todos los tratamientos, aunque la mayor concentración se observó en los tratamientos con CLA ($P < 0.05$). A los 30 días de conservación aumentó la concentración de este compuesto en la yema de todos los tratamientos, principalmente en los que tenían CLA, aunque las diferencias, con respecto al día 0, no fueron significativas ($P > 0.05$), excepto en el caso del T4 (DB+AS+2%CLA) donde la generación de este compuesto fue significativamente superior a todos los otros tratamientos y al día 0 ($P < 0.05$) (Figura 18).

A los 60 días de conservación, se observó, contrario a lo esperado, una reducción de MDA en todos los tratamientos ($P < 0.05$), con respecto al día 30. Resultando significativa en todos excepto en T3, donde los niveles de MDA se mantuvieron constantes a los 0, 30 y 60 d de conservación.

Es importante señalar que en los tratamientos que incluían CLA, la apariencia de los huevos no era muy agradable, parecían huevos viejos, las yemas se rompían fácilmente y la clara se veía muy rosada. Presentaban además un fuerte olor a pescado.



^{a-f} Literales distintas indican diferencia estadística ($P < 0.05$).

T1- dieta base (DB), T2- DB+AS, T3- DB+AS+1%CLA, T4-DB+AS+2%CLA

Figura 18. Concentración de MDA (nmol/mL) en la yema de huevos conservados durante varios días a temperatura ambiente al suplementar la dieta de las gallinas con aceite de sardina junto con ácido linoleico conjugado

Discusión

Variables productivas

Los resultados obtenidos concuerdan con lo informado por Cachaldora et al. (2006,2007), en el sentido de que ellos tampoco encontraron efecto alguno sobre el consumo de alimento y peso del huevo al suplementar la dieta de las aves con diferentes tipos de aceites de pescado y diferentes niveles de inclusión del mismo (1.5%, 3%, 4.5% y 6.0%). Sin embargo, al igual que en el presente trabajo, observaron un decremento lineal y cuadrático en la producción de huevo. En el color de la yema observaron una interacción entre el tipo y concentración del aceite de menhaden, incrementándose ésta cuando las gallinas recibieron aceite de menhaden MFO1 (que tenía 8.3% de EPA y 8.2% de DHA), en comparación con MFO2 y MFO3 cuyas proporciones de estos dos AG eran diferentes (EPA 21% y DHA 7% en MFO2; EPA 8% y DHA 21% en MFO3).

Pappas et al. (2006) observaron una significativa reducción en el peso del huevo al suministrar a las aves, dietas suplementadas con 5.5% de aceite de pescado. Cherian (2008)

informa un decremento en el peso del huevo y en el color de la yema al adicionar 3.5% de aceite de pescado a la dieta.

Otros autores observaron una reducción tanto en la producción como en el peso del huevo, al suplementar la dieta para gallinas ponedoras con aceite de pescado (Hargis and Van Elswyk, 1993; Cloughley et al.1997; Maurice, 1994; González-Esquerra and Leeson, 2001; Surai and Spark, 2001), con 4.8% de una microalga marina con alto contenido de DHA (Herber–McNeill and Van Elswyk, 1996), y cuando han utilizado al cebo (5 a 7%) como única fuente de grasa en dietas para gallinas ponedoras (Watkins y Elkin 1992, Grobas et al. 2001, González-Muñoz et al. 2009).

Cornejo et al.. (2008) y Cherian et al. (2007) no encontraron cambios en las variables productivas al incorporar 6% de AP en el primer caso; así como 0.25% y 0.5% de AP en el segundo caso.

Algunos autores (Van Elswyk 1997a; González-Esquerra y Lesson, 2001; Cachaldora et al. 2006) señalan que la disminución observada en la producción y/o peso del huevo pudiera deberse al efecto reductor de los AGn3 sobre la cantidad de lípidos y estradiol en suero (lo que limitaría la disponibilidad de lípidos para la formación de yema). Sin embargo, otro factor pudiera ser el hecho de que al suministrar en la dieta ingredientes con alto contenido de AGn3, se reduce la concentración del ácido linoleico (C18:2 n6 LA) y por ende la producción de la PGE₂ (Simopoulos, 2006, 2008). Algunos estudios (Hertelendy and Biellier, 1978; Hudelson and Hudelson, 1996), han demostrado que la PGE₁ y la PGE₂ son de gran importancia en el proceso reproductivo, estimulan las contracciones, relajan el esfínter uterovaginal y la vagina facilitando la ovoposición en la gallina. Por lo tanto, al existir en el ave un decremento en la producción de estas hormonas como consecuencia de la reducción sérica del LA, precursor del AA y este de eicosanoides como la PGE₁ y PGE₂, la producción y peso del huevo se ven afectadas (Lee and Hwang, 2008; Simopolous, 2008).

Los eicosanoides provenientes del AA son biológicamente activos aun en pequeñas cantidades, mientras que los eicosanoides provenientes del EPA poseen una baja actividad biológica (Simopolous, 2006).

Por otra parte, los resultados obtenidos en este estudio al suplementar la dieta con AS+CLA difieren de lo observado por Alvarez et al. (2004), quienes en su estudio no encontraron efecto alguno sobre las variables productivas de las aves y color de la yema al suplementar la dieta con aceite de pescado (1.4% y 2%) y CLA (1%, 3% y 5%). Cherian et al. (2007a) tampoco observaron cambios en las variables productivas cuando proporcionaron a las gallinas, dietas suplementadas con grasa amarilla (2.5%), aceite de pescado (0.25%) y CLA (0.25%) por un periodo de 12 meses. Szymczyk y Pisulewski (2003) no vieron afectadas las variables productivas cuando suplementaron las dietas con 0, 5, 10,15 ó 20 g de CLA/kg.

Sin embargo, en otros aspectos concuerdan con informado por otros autores. Por ejemplo, la reducción en el color de la yema observada en los tratamientos T3 y T4 donde las dietas se suplementaron con CLA, fue observada también por Chamruspollert y Sell (1999), quienes encontraron que características físicas como el el color de la yema y el sabor del huevo fueron afectados negativamente, cuando las dietas contenían 5% de CLA. Aydin et al. (2001) también informan un aumento en la mortalidad del embrión así como una reducción en el color de la yema. Suksombat et al. (2006) realizaron un estudio en el que suplementaron la dieta de las gallinas con 1%, 2%, 3% y 4% de CLA; y encontraron que con 4% el peso del huevo, de la yema y del albumen se reducía significativamente. El color de la yema disminuyó conforme aumentó el nivel de inclusión del CLA.

Coloración de la yema

El aumento en la coloración de la yema cuando la dieta fue suplementada con AS seguramente se debió a la presencia de pigmentos en el mismo, los cuales varían de acuerdo a la alimentación de los peces (Bailey, 1978; Roldan-Libenson et al. 1999). En el caso de la sardina, su principal alimento es el fitoplacton (Cellamare et al. 1999), el cual posee pigmentos tales como clorofila, antocianinas, luteína, diatoxantina, fucoxantina, zeaxantina y violaxantina (Millan et al. 2004). Por lo tanto, en el aceite de sardina seguramente estos pigmentos estaban presentes y las xantofilas fueron depositadas en la yema. Por otra parte, el hecho de que las yemas estaban más pigmentadas en el T2 puede ser una indicación de que el aceite de sardina utilizado estaba en buenas condiciones, ya que cuando existe un

proceso de oxidación, las propiedades cromógenas pueden reducirse, ya que los carotenoides están formados por cadenas hidrocarbonadas altamente insaturadas (Bailey, 1984; Clydesdale, 1998).

Sin embargo, la disminución en el color de la yema cuando las dietas fueron suplementadas con AS+CLA, la coloración rosa que adquirió el albumen, así como la consistencia viscosa observada en la misma, pudieran ser resultado del aumento en la permeabilidad de la membrana vitelina del huevo debido a los cambios en la composición de ácidos grasos inducidos por el CLA, tal como lo señala Aydin et al. (2001). Abou-ashour y Edwards (1970) sugieren que un mayor contenido de C18:0 en la yema, probablemente aumenta la permeabilidad de la membrana vitelina. Por otra parte, la coloración rosa en el albumen puede ser atribuida a una combinación de la ovotransferrina con el hierro presente en la yema que difunde hacia el álbumen. Aydin et al. (2001) observaron que al aumentar el CLA la permeabilidad de la membrana, minerales como el hierro, calcio y magnesio se mueven de la yema al albumen, mientras que el magnesio y el sodio hacen lo contrario, se mueven del albumen a la yema. Y esto lo confirmaron todavía mas cuando separaron la yema del albumen, manteniéndolos en refrigeración (4 C) por un mes y no observaron cambios en el color de la yema y en el albumen.

Acidos grasos en el huevo

Adicionar 2% de CLA a dietas suplementadas con 2.5% de AS resultó en una reducción de aproximadamente 50% del total de los AGM en el huevo, los cuales fueron remplazados por AGS. Estos resultados concuerdan con lo reportado por Cherian et al. (2002) cuando suministraron 2% de CLA+3% de aceite de menhaden en la dieta de las aves. Alvarez y col (2004), también hallaron un efecto notable en el perfil de ácidos grasos en el huevo cuando suministraron en forma combinada aceite de pescado (0%, 1.4%, 2%) y CLA (1%, 3%, 5%) en la dieta de las aves. Ellos observaron un incremento lineal de los AGS: C14:0, C16:0 y C18:0 y un decremento lineal de C16:1, C18:1 y C18:2.

La explicación a esto radica en el hecho de que la enzima delta9-desaturasa es la responsable de convertir los ácidos palmítico (C16:0) a palmitoleico (C16:1 n9) y el esteárico (C18:0) a ácido oleico (C18:1n9); sin embargo, el CLA ejerce un efecto

inhibitorio sobre las desaturasas, lo cual ocasionó una reducción en la concentración de los AGM y una acumulación de AGS en el huevo (Cherian et al. 2002, Alvarez et al. 2004, Huang et al. 2008).

Lee et al. (1998) propone también que el isómero t10,c12 del CLA inhibe la acción de la enzima hepática estearoyl-coenzyme A desaturasa, la cual cataliza la inserción de un doble enlace entre los átomos C9 y C10 del ácido palmítico (C16:0) o del esteárico (C18:0) para la formación del ácido palmitoleico (C16:1 n7) y del oleico (C18:1 n9), respectivamente.

El ácido oleico es uno de los principales ácidos grasos en la yema del huevo, constituye aproximadamente el 40% del total de los AG (TAG) y es de vital importancia en los procesos reproductivos del ave, como la supervivencia del embrión. Se sabe que cuando el ácido estearico (C18:0) representa más del 12% del TAG y el oleico (C18:1 n9) menos del 40% del TAG la incubabilidad se ve seriamente afectada y puede haber una alta mortalidad de embriones (Aydin et al. 2001).

Algunos autores han observado que el CLA incrementa la concentración de los ácidos esteárico, docosatetraenoico y docosapentaenoico (C22:5 n3) en los lípidos del suero; mientras que la concentración del palmítoleico, oleico y di-homo-gamma-linolénico decrece. Como el CLA es fácilmente incorporado en los fosfolípidos de la membrana, esto puede ocasionar que: 1) el ácido araquidónico sea remplazado por el CLA en la membrana celular, 2) la disponibilidad del AA para la síntesis de eicosanoides se reduzca, 3) al competir el CLA por las enzimas que participan en las rutas metabólicas de los ácidos grasos, se afecte la síntesis del AA, y 4) que haya un decremento en la actividad de las enzimas delta-6, delta-9 y un incremento en la actividad de la delta-5 desaturasa (Huang et al. 2008).

Se cree que suplementar la dieta de las aves con CLA junto con otra fuente de ácidos grasos como el oleico, linoleico o linolénico revierte estos efectos negativos (Kim et al. 2007). Cuando (Alvárez et al. 2004) cosuplementaron 2% CLA con 3% de aceite de girasol, la concentración de AGM logró incrementarse pero la de CLA decreció. Aydin et al. (2001) encontraron que suplementar la dieta con aceite de oliva evita los efectos adversos del CLA en el huevo.

Asimismo, observar que la concentración de los AGn3: EPA, DPA y DHA en el huevo fue superior cuando las dietas fueron suplementadas con AS+CLA con acuerdo con observaciones realizadas por otros autores en el sentido de que el CLA mejora la síntesis y deposición de los AGn3 (Du et al. 2000, Cherian et al. 2002, Raes et al. 2002). Emken (1984) menciona que ácidos grasos 18:1 *cis* y *trans* reducen la síntesis de 20:4 (AA) y aceleran la síntesis de 20:5 n3 y 20:3 n9.

Por otra parte, fue interesante observar que la concentración de los isómeros de CLA encontrados en el huevo no fue un reflejo de las proporciones de estos en la dieta. En el cuadro 2 se observa que la proporción de los isómeros c9, t11 y t10, c12 en las dietas fue casi igual (8% y 7% del total de AG en la dieta T3; 10.1% y 9.7% en T4). Sin embargo, en la yema de huevo estas proporciones difirieron notablemente (2% y 1% en T3; 3.7% y 1.7% en T4). Esto con acuerdo con lo señalado por otros autores (Chamruspollert y Sell, 1999, Shang et al. 2004) quienes encontraron que c9, t11 y t10, c12 es el principal isómero que se deposita en yema, constituyendo aproximadamente 50 a 65% del total de CLA en el huevo.

La razón por la cual este isómero se deposita en mayores concentraciones en el huevo, que el t10, c12, no es muy clara aun, sin embargo se cree que esto pudiera estar relacionado con el hecho de que algunos isómeros son mas efectivamente metabolizados que otros (Shang et al. 2004). También pudiera deberse al hecho de que la forma *trans* de los AG es mas termodinámicamente estable que los enlaces o configuración *cis*, y por tanto son menos reactivos químicamente (Sadler y Watford, 1999).

Efecto del tiempo sobre la composición en AG del huevo almacenado a temperatura ambiente

En general, en cada uno de los tratamientos la concentración de AG así como la relación n6:n3 se mantuvieron sin cambio, a lo largo de los 60 días en que se conservaron a temperatura ambiente. Esto con acuerdo con lo señalado por otros autores quienes señalan que el perfil de AG de huevos enriquecidos con AGn3 no se altera durante el cocimiento (Van Elswyk et al.1992) o durante siete semanas de almacenamiento a 25 C (Oku et al. 1996). Algunos autores lo atribuyen al hecho de que los huevos son altamente resistentes a

la oxidación lipídica porque están dentro de un sistema cerrado el cual contiene en forma natural antioxidantes tales como la vitamina E, la ovotransferrina, la fosvitina, carotenoides, etc (Ping and Peng, 1985; Guerin-Dubiard et al. 2007).

La formación de MDA, tanto en el tratamiento T1 como en los que se suplementó con AS, indica que desde el momento en que el huevo se expone a factores externos como la luz y la temperatura, se inicia el proceso oxidativo. Pero el hecho de haya una mayor cantidad de MDA en el T2, también demostró que suplementar la dieta con AS favorece aun mas la formación de radicales libres (RL), y que adicionar CLA no contribuyó a evitar la formación de MDA, por lo contrario aumentó y esto se hizo mas evidente a los 30 días.

El hecho de que haya habido una mayor formación de MDA cuando las dietas tenían CLA concuerda con lo observado por Cherian et al. (2007b) y pudo deberse a lo siguiente, tal como lo explican estos mismos autores. El CLA se incorpora preferentemente en los triglicéridos de la yema, mientras que el EPA y DHA en los fosfolípidos. En la yema del huevo, los fosfolípidos y las proteínas están intercrossados en la superficie exterior de las lipoproteínas de baja densidad. Esta capa tan compacta puede evitar la entrada de oxígeno impidiendo la oxidación. Por lo tanto, es posible que la configuración estructural de los fosfolípidos haya ayudado a prevenir la oxidación de los AGn3.

Estudios *in vitro* e *in vivo* han mostrado que el CLA tiene un potente efecto antioxidante, tan efectivo como el butilhidroxitolueno (BHT), mas potente que el alfa-tocoferol y el beta-caroteno (Huang, 2008). Atribuyéndose al isómero *trans* 10, *cis* 12 la propiedad antioxidante (Leung y Liu, 2000). Sin embargo, en este estudio no ocurrió así.

Marshall et al. (1994) notaron que en el huevo fresco de gallinas cuya dieta había sido suplementada con 1.5% de aceite de menhaden, presentaba mayor concentración de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS) que en el huevo de gallinas sin suplementar. Aun cuando a la dieta con aceite de menhaden se le habían adicionado 12.5 mg de alfa-tocoferol/ave/d (la recomendación del NRC para una dieta convencional es de 0.5 mg/ave/d).

Al parecer y tal como sucede con concentraciones altas de vitamina E, el CLA actuo en este caso como prooxidante mas que como antioxidante (Banni et al. 1998; Chen et al. 1998; Gebert et al. 1998; Leeson et al. 1998; Franchini et al. 2002; Carrillo et al.2012). Van

den Berg et al. (1995) señala que el CLA no es un efectivo atrapador de radicales libres en comparación con la vitamina E y el BHT que sus papel como antioxidante no es factible. Cantwell et al. (1999) mencionan que el CLA reduce la actividad de las enzimas catalasa, superóxido dismutasa y glutatión peroxidasa e induce a una lipoperoxidación.

Por otra parte, es posible que los compuestos oxidados detectados desde el primer día de almacenamiento en todos los tratamientos, mediante la prueba de TBARS, hayan sido otros diferentes a los AG. y que tal como se mencionó antes, los antioxidantes propios en el ave (carotenoides, vitamina E, fosvitina, selenio, etc), presentes en el huevo (Guérin-Dubiard et al. 2007), hayan contribuido a proteger a estos AG por la importancia fisiológica que estos tienen para el ave (Romanoff, 1960; Freeman y Vince, 1974; Noble y Cocchi, 1990). Marshall et al. (1994) sugieren que los TBARS en yema pudieran ser el resultado de la transferencia directa de lípidos oxidados presentes en la dieta o producidos en el hígado y posteriormente transferidos a la yema junto con otros materiales lipofílicos.

La síntesis de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS) en el hígado de gallinas ponedoras ha sido confirmado por Caston et al. (1994) cuando comparó una dieta convencional como testigo contra otras que tenían 10 ó 20% de linaza molida. Encontraron un incremento de TBARS en el hígado, proporcional al nivel de inclusión de linaza en la dieta.

Aymond and Van Elswyk (1995) sugieren que las condiciones en las que se almacenan las dietas, tal como el uso de contenedores hermeticos mantenidos en refrigeración, pueden reducir una potencial deposición de TBARS en la yema.

De igual manera, el hecho de que a los 60 días la concentración de MDA haya sido menor que al inicio y que a los 30 de almacenamiento no precisamente indica que haya habido menor oxidación, lo mas probable es que se hayan formado otros compuestos productos de la oxidación, diferentes al MDA y no pudieron ser medidos a través de la prueba de TBARS. Se sabe que durante la oxidación lipídica se generan los precursores del MDA (hidroxiperoxi epidioxidos, 1,3 dihidroxiperoxidos, 1,4 dihidroperóxido y los monohidroxiperoxidos) así como diversos compuestos que pueden reaccionar con el TBA por lo que los datos obtenidos con este método no son un reflejo exacto del grado de oxidación del sistema. Por lo tanto sería recomendable utilizar otras pruebas, además de la de

TBARS, para conocer con mayor precisión el grado de oxidación en el huevo y poder identificar los compuestos que se oxidaron (Frankel y Neff, 1983; Guillen-Sanz y Guzmán-Chozas, 1998).

Conclusión

Es cierto que agregar CLA a dietas suplementadas con aceite de sardina, aumenta aun mas la concentración de ácidos grasos omega tres en el huevo; pero también la de los AGS. Lo cual no es deseable, pues esto esta asociado a un incremento en el riesgo de padecer enfermedades cardiovasculares. Además, la reducción en la concentración del ácido oleico y de otros ácidos grasos en el huevo causada por el CLA aumenta la permeabilidad de la membrana vitelina de la yema originado cambios físicos en el huevo, desagradables para el consumidor.

El efecto antioxidante del CLA en el huevo aun es controvertido. Es necesario continuar realizando estudios que ayuden a conocer mejor la acción del CLA como antioxidante, sus mecanismos y cual es la concentración mas adecuada, para evitar se formen productos de oxidación. Así como aclarar si son los ácidos grasos presentes en el aceite de pescado los compuestos que se están oxidando, o son otros compuestos presentes en el huevo, los aceites o en las dietas.

Referencias

- Abo-ashour AM, Edwards HM. 1970. Effect of dietary sterculia foetida oil on pink-white discoloration and fatty acid distribution in stored eggs. *J Nutr* 100:757-766.
- Ahn DU, Sell JL, Jo C, Chamruspollert M, Jeffrey M. 1999. Effect of dietary conjugated linoleic acid on the quality characteristics of chicken eggs during refrigerated storage. *Poultry Sci.* 78: 922-928.
- Aii T, Matsuzaki S, Sakamoto K, Hayasawa H, Shimuzu T, Ishida S. 1999. A newly discovered effect of conjugated linoleic acid: damage to the hatchability of fowl eggs. *Anim Sci J.* 70:246-247.
- Alvarez C, Cachaldora P, Méndez J, García-Rebollar P, De Blas JC. 2004. Effects of dietary conjugated linoleic acid and fish oil supplementation on performance and egg quality in laying hens. *Br Poult Sci.* 45, 524-529.
- Anton M. 2007. Composition and structure of hen egg yolk. In: *Bioactive Egg Compounds*. Rainer Huopalahti, Rosina López-Fandiño, Marc Anton and Rüdiger Schade (editors), pp.1-6. Springer-Verlag Berlin Helderberg.
- Anzaldúa-Morales A. 1994. *La Evaluación Sensorial de los Alimentos en la Teoría y en la Práctica*. Editorial Acribia, Zaragoza, España.
- AOAC.2000. *Official Methods of Analysis*. 17th ed. Association Official of Analytical Chemists. AOAC International. Washington D.C. USA.

- Aymond WM, Van Elswyk ME. 1995. Yolk thiobarbituric acid reactive substances and n-3 fatty acids in response to whole and ground flaxseed. *Poult Sci*. 74:1388-1394.
- Aydin R. 2005. Conjugated linoleic acid: chemical structure, sources and biological properties. *Turk J Vet Anim Sci*. 29:189-195.
- Aydin R, Pariza MW, Cook ME. 2001. Olive oil prevents the adverse effects of dietary conjugated linoleic acid on chick hatchability and egg quality. *J Nutr* 131:800-806.
- Azain MJ. 2003. Conjugated linoleic acid and its effects on animal products and health in single-stomached animals. *Proc Nutr Soc* 62: 319-328.
- Bailey AE. 1984. *Aceites y Grasas Industriales*. Segunda edición. Editorial Reverté. 675 pp.
- Banni S, Angioni E, Contini MS, Carta G, Casu V, Iengo GA, Melis MP, Deiana M, Dessi MA, Corongiu FP. 1998. Conjugated linoleic and oxidative stress. *JAOCS* 75:261-267.
- Botsoglou NA, Fletouris DJ, Papageorgiou GE, Vassilopoulos VN, Mantis AJ, Trakatellis AG. 1994. Rapid, sensitive, and specific thiobarbituric acid method for measuring lipid peroxidation in animal tissue, food, and feedstuff samples. *J Agric Food Chem* 42: 1931-1937.
- Cachaldora P, García-Rebollar P, Álvarez C, De Blas J, Méndez J. 2006. Effect of type and level of fish oil supplementation on yolk fat composition and n-3 fatty acids retention efficiency in laying hens. *Br Poult Sci* 47: 43-49.
- Cachaldora P, García-Rebollar P, Alvarez C, De Blas JC, Méndez J. 2007. Effect of type and level of basal fat and level of fish oil supplementation on yolk fat composition and n-3 fatty acids deposition efficiency in laying hens. *Anim Feed Sci Tech* 141: 104-114.
- Cantwell H, Devery R, O'shea M, Stanton C. 1999. The effect of conjugated linoleic acid on the antioxidant enzyme defense system in rat hepatocytes. *Lipids* 34:833-839.
- Carrillo S, Avila E, Vasquez C, Calvo C, Carranco ME, Pérez-Gil F. 2012. Modificación en la composición de ácidos grasos del huevo al incluir aceite de sardina y ácido linoleico conjugado en dietas para gallinas ponedoras. *Arch Med Vet* 44: 243-251.
- Carrillo DS, Avila GE, Vasquez PC, Fuente MB, Calvo CC, Carranco JME, Pérez-Gil RF. 2012b. Effects of adding vitamin E to diets supplemented with sardine oil on the production of laying hens and egg fatty acid composition. *African J Food Sci* 61(1):12-19.
- Chamrusspollert M, J Sell. 1999. Transfer of dietary conjugated linoleic acid to egg yolks of chickens. *Poult Sci* 78: 1138-1150.
- Chen ZY, Chan PT, Kwan KY, Zhang A. 1997. Reassessment of the antioxidant activity of conjugated linoleic acid. *J Am Oil Chem Soc*. 74: 749-753.
- Cherian G, Holsonbake TB, Goeger MP, Bildfell R. 2002. Dietary conjugated linoleic acid alters yolk and tissue fatty acid composition and hepatic histopathology of laying hens. *Lipids* 37:751-757.
- Cherian G, González D, Ryu KS, Goeger MP. 2007a. Long-term feeding of conjugated linoleic acid and fish oil to laying hens: effects on hepatic histopathology, egg quality, and lipid components. *J Appl Poul Res* 16:420-428.
- Cherian G, Traber MG, Goeger MP, Leonard SW. 2007b. Conjugated linoleic acid and fish oil in laying hen diets: effects on egg fatty acids, thiobarbituric acid reactive substances, and tocopherols during storage. *Poult Sci* 86:953-958.
- Cherian G. 2008. Egg quality and yolk polyunsaturated fatty acid status in relation to broiler breeder hen age and dietary n-3 oils. *Poult Sci*. 87:1131-1137.
- Chow CK. 2008. *Fatty Acids in Foods and their Health Implications*. Third edition. CRC Press, Boca Raton, Florida, USA. 1281 p.
- Clydesdale EM. 1998. Color: origin, stability, measurement and quality. In: *Food Storage Stability*. Irwin A. Taub and R. Paul Singh (eds). pp.175-190. CRC Press, Boca Raton, Fla, USA.
- Cloughley J, Noble R, Speake B, Sparks N. 1997. Manipulation of docosahexaenoic (C22:6 n3) acid in the chicken's egg. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids* 57:222.
- Cornejo S, Hidalgo H, Araya J, Pokniak J. 2008. Suplementación de dietas de gallinas de postura comercial con aceites de pescado de diferentes grados de refinación. Efectos productivos en las aves y en la calidad organoléptica de los huevos. *Arch Med Vet* 40: 45-50.
- Du M, DU Ahn, JL Sell. 2000. Effects of dietary conjugated linoleic acid and linoleic: linolenic acid ratio on polyunsaturated fatty acid status in laying hens. *Poult Sci* 79, 1749-1756.

- Emken E. 1984. Nutrition and biochemistry of trans and positional fatty acid isomers in hydrogenated oils. *Ann Rev Nutr* 4:339-376.
- Franchini A, Sirri F, Tallarico N, Minelli G, Iaffaldano N, Meluzzi A. 2002. Oxidative stability and sensory and functional properties of eggs from laying hens fed supranutritional doses of vitamin E and C. *Poult Sci*. 81: 1744-1750.
- Frankel EN, Neff WE. 1983. Formation of malonaldehyde from lipid oxidation products. *Biochem Biophys Acta* 754:264-270.
- Freeman BM, Vince MA. 1974. Development of the Avian Embryo. John Wiley and Sons, New York.
- González-Esquerra R, Leeson S. 2001. Alternatives for enrichment of eggs and chicken meat with omega-3 fatty acids. *Can J Anim Sci*. 81(3):295-305.
- González-Muñoz M, Bastida S, Jiménez O, Lorenzo de C, Vergara G, Sánchez-Muñiz F. 2009. The effect of dietary fat on the fatty acid composition and cholesterol content of the eggs from Hy-line and Warren hens. *Grasas y Aceites* 60: 350-359.
- Grobas S, Méndez J, Lazaro R, De Blas C, Mateos GG. 2001. Influence of source and percentage of fat added to diet on performance and fatty acid composition of egg yolks of two strains of laying hens. *Poult Sci*. 80:1171-1179.
- Grobas S, Méndez J, Lopez Bote C, De Blas C, Mateos GG. 2002. Effect of vitamin E and A supplementation on egg yolk α -tocopherol concentration. *Poult Sci* 81:376-381.
- Guérin-Dubiard C, Castellani O, Anton M. 2007. Egg compounds with antioxidant and mineral binding properties. In: Huopalahati R, López-Fandiño R, Anton M, Schade R (eds.), *Bioactive Egg Compound*, Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, 223-228.
- Guillén-Sans R, Guzmán-Chozas M. 1998. The thiobarbituric acid (TBA) reaction in foods: A Review. *Crit Rev Food Sci Nutr* 38(4):315-350.
- Ha YL, Storkson J, Pariza MW. 1990. Inhibition of benzo(a)pyrene induced mouse forestomach neoplasia by conjugated dienoic derivatives of linoleic acid. *Cancer Res*. 50: 1097-1101.
- Hargis PS, Van Elswyk ME. 1993. Manipulating the fatty acid composition of poultry meat and eggs for the health conscious consumer. *World's Poultry Sci J*. 49:251-264.
- Herber-McNeill SM, Van Elswyk ME. 1996. Dietary marine algae promote efficient deposition of n-3 fatty acids for the production of enriched shell eggs. *Poult Sci* 75:1501-1507.
- Hertelendy F, Bielliere HV. 1978. Prostaglandin levels in avian blood and reproductive organs. *Biol. Reprod*. 18:204-211.
- Holub BJ. 2002. Clinical nutrition: 4. Omega-3 fatty acids in cardiovascular care. *JAMC* 166(5):608-615.
- Huang YS, Yanagita T, Nagao K. 2008. Biological effects of conjugated linoleic acid. In: *Fatty Acids in Foods and Their Health Implications*. Ching Kwang Chow (ed). Third edition. CRC Press, Boca Raton, Florida, USA. Pp. 825-836.
- Hur SJ, Park GB, Joo SJ. 2007. Biological activities of conjugated linoleic acid (CLA) and effects of CLA on animal products. *Livestock Sci*. 110:221-229.
- Ip C. 1997. Review of the effects of trans fatty acid, oleic acid, n-3 polyunsaturated fatty acids, and conjugated linoleic acid on mammary carcinogenesis in animals. *Am J Clin Nutr* 66: 1523-1529.
- Jones S, Ma DWL, Robinson FE, Field CJ, Clandinin M. 2000. Isomers of conjugated linoleic acid (CLA) are incorporated into egg yolk lipids by CLA-fed laying hens. *J Nutr* 130:2002-2005.
- Kim JH, Hwangbo J, Choi NJ, Park HG, Yoon DH, Park EW, Lee SH, Park BK, Kim YJ. 2007. Effect of dietary supplementation with conjugated linoleic acid, with oleic, linoleic, or linolenic acid on egg quality characteristics and fat accumulation in the egg yolk. *Poult Sci* 86:1180-1186.
- Lee KN, Pariza MW, Ntambi JM. 1998. Conjugated linoleic acid decreases hepatic stearyl-CoA desaturase mRNA expression. *Biochem Biophys Res Commun* 248:817-821.
- Lee JY, Hwang DH. 2008. Dietary fatty acids and eicosanoids. In: *Fatty Acids in Foods and their Health Implications*. Ching Kwang Chow (editor). pp.713-726. Third edition. CRC Press, Boca Raton, Fla, USA.
- Leeson, S, Caston L, Maclaurin T. 1998. Organoleptic evaluation of eggs produced by laying hens fed diets containing graded levels of flaxseed and vitamin E. *Poult Sci* 77:1436-1440.
- Leung YH, Liu RH. 2000. Trans 10, cis 12-conjugated linoleic acid isomer exhibits stronger oxyradical scavenging capacity than cis-9, trans-11-conjugated linoleic acid isomer. *J Agric Food Chem* 48:5469-5475.

- Marshall AC, Sams AR, Van Elswyk ME. 1994. Oxidation stability and sensory quality of stored eggs from hens fed 1.5% menhaden oil. *J Food Sci* 59:561-563.
- Maurice DV. 1994. Dietary fish oils. Feeding to produce designer eggs. *Feed Management* 45: 29-32.
- Meilgaard M, Civille GV, Carr BT. 1999. *Sensory Evaluation Techniques*. CRC Press. Boca Raton, Florida, USA, 387 pp.
- NRC. 1994. *Nutrient Requirement of Poultry*. National Research Council, 9th rev ed. Academy Press, Washington DC, USA.
- Oku T, Kato H, Kunishige-Taguchi T, Hattori M, Wada K, Hayashi M. 1996. Stability of fat soluble components such as n-3 polyunsaturated fatty acids and physiochemical properties in EPA and DHA enriched egg. *Jap J Nutr* 54:109-119.
- Pike O, Peng I. 1985. Stability of shell egg and liquid yolk to lipid oxidation. *Poult Sci* 64:1470-1475.
- Pariza M, Ha Y. 1990. Conjugated dienoic derivatives of linoleic acid a new class of anticarcinogens. *Med Oncol Tumor Pharmacother* 7: 169-171.
- Raes K, Huyghebaert G, de Smet S, Nollet L, Arnouts S, Demeyer D. 2002. The deposition of conjugated linoleic acid in eggs of laying hens fed diets varying in fat level and fatty acid profile. *J Nutr* 132:182-189.
- Romanoff AL. 1960. *The Avian Embryo*. McMillan, Nw York, USA.
- Sadler M, Watford I. 1999. Health effects of trans fatt . In: BSadler MJ, Strain JJ, Caballero B (eds). *Encyclopedia of Human Nutrition*. Volume II, Academic Press, San Diego, USA, pp. 769-776.
- Salih AM, Smith DM, Price JF, Dawson LE. 1987. Modified extraction 2 thiobarbituric acid method for measuring lipid oxidation in poultry. *Poult Sci* 66:1483-1488.
- SAS. 2008. *Statistical Analysis System/STAT. User's Guide*. SAS Institute Inc. Cary, NC. USA.
- Sanhueza C, Nieto K, Valenzuela B. 2002. Ácido linoleico conjugado: un ácido graso con isomería *trans* potencialmente beneficioso. *Rev Chil Nutr* 29, 98-105.
- Shang XG, Wang FL, Li DF, Yin JD, Li JY. 2004. Effects of conjugated linoleic acid on the productivity of laying hens and egg quality during refrigerated storage. *Poult Sci* 83, 1688-1695.
- Simopoulos AP. 2006. Evolutionary aspects of diet, the omega-6/omega-3 ratio and genetic variation: nutritional implications for chronic diseases. *Biomed Pharmacother* 60:502-507.
- Simopoulos AP. 2008. The importance of the omega-6/omega-3 fatty acid ratio in cardiovascular disease and other chronic diseases. *Exp Biol Med* 233:674-688.
- Suksombat W, Samitayotin S, Lounglawan P. 2006. Effects of conjugated linoleic acid supplementation in layer diet on fatty acid compositions of egg yolk and layer performances. *Poult Sci* 85, 1603-1609.
- Surai PF, Sparks NHC. 2001. Designer eggs: from improvement of egg composition to functional food. *Trends in Food Sci. Tech.* 12:7-16.
- Szymczyk B, Pisulewski PM. 2003. Effects of dietary conjugated linoleic acid on fatty acid composition and cholesterol content of hen egg yolks. *Brit J Nutr.* 90:93-99.
- Van den Berg JJM, Cook NE, Tribble DL. 1995. Reinvestigation of the antioxidant properties of conjugated linoleic acid. *Lipids* 30:599-605.
- Van Elswyk ME, Sams A, Hargis PS. 1992. Composition, functionality and sensory evaluation of eggs from hens fed menhaden oil. *J Food Sci.* 57:342-349.
- Van Elswyk ME. 1997a. Comparison of n-3 fatty acid sources in laying hen rations for improvement of whole nutritional quality: a review. *Brit J Nutr* 78:Suppl.1 S61-S69.
- Watkins B, Elkin R. 1992. Dietary modulation of oleic and stearic acids in egg yolks. *J Food Comp Anal* 5: 209-215.

VII. ARTICULOS YA PUBLICADOS

Full Length Research Paper

Effects of adding vitamin E to diets supplemented with sardine oil on the production of laying hens and fatty-egg acid composition

Carrillo-Domínguez S.^{1,2*}, Avila G.E.¹, Vásquez P.C.¹, Fuente B.¹, Calvo C.C.², Carranco J.M.E.² and Pérez-Gil Romo F.²

¹Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, UNAM, México D.F, México.

²Departamento Nutrición Animal del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán, Mexico.

Accepted 26 October, 2011

The aim of this study was to know the effect of adding vitamin E (VE) (100 and 200 mg/kg) to diets supplemented with sardine oil (SO) on egg fatty-acids (FA) composition. 240 Bovans hens were grouped into four treatments: T1- basal diet (BD), T2-BD+2.5% SO, T3-BD+2.5% SO+100 mg/kg VE, and T4-BD+2.5% SO+200 mg/kg VE. After four weeks, eggs were collected from each treatment, and analyzed FA content using gas chromatography. Results: a) 14:0, 16:0, 16:1, 20:5n3, 22:6n3 and 22:6n3 content were higher in eggs from treatments with SO (T2) and n6:n3 ratio was better (11:1 vs 2:1) than the control group (T1) ($P<0.05$); b) T3 had a reduction of 16:0, 16:1, 18:2n6 and 18:3n3 in eggs ($P>0.05$); c) T4 had a reduction on the concentration of saturated and polyunsaturated FA in eggs ($P<0.05$). The productive parameters were no affected, only egg yolk color increased when SO was added to the diets ($P<0.05$). It is concluded that adding SO to laying hens diet increases n3 FA in eggs, and that adding large quantities (100 or 200 mg/kg) of VE to diets supplemented with SO reduce the concentration of the polyunsaturated FA.

Key words: Vitamin E, sardine oil, egg fatty acid, laying hen, egg composition, egg lipids.

INTRODUCTION

Omega-3 fatty acids (n3FA), mainly eicosapentaenoic acid (C20:5 n3 EPA) and docosahexaenoic acid (C22:6 n3 DHA), are essential for normal growth and development. Also, they have an important role in the prevention and treatment of coronary heart disease, hypertension, diabetes, arthritis, other inflammatory and autoimmune disorders and some types of cancer, and in neuronal development (Simopoulos, 2000; Kris-Etherton et al., 2002). Recent dietary fat studies have centered on the manipulation of specific fatty acids. In an attempt to increase n3 FA content in eggs, the utilization of fish and flaxseed as feed ingredients has been a common

practice (Baucells et al., 2000; González-Esquerra and Leeson, 2001; Castillo-Badillo et al., 2005).

In Mexico, as in other western countries, there is a low consumption rate of fish due to common eating habits and cost, among other factors (CONAPESCA, 2010; Kris-Etherton et al, 2002). For this reason, one alternative has been the incorporation of fishing industry byproducts with high n3 PUFAs content, such as fish oil, into the diet of hens, with the goal of concentrating n3 PUFAs in the egg yolk.

Some researchers (González-Esquerra and Leeson 2001; Simopoulos 2000; Leskanich and Noble, 1997) believe that eggs are excellent vehicles to achieve this objective for multiple reasons, including their low calorie content (75 kcal/egg), protein quality, culinary versatility and low cost. In Mexico, the consumption rate of fresh eggs is the highest in the world (21.6 kg/per capita annually) (UNA, 2010). A fresh egg is understood as an

*Corresponding author. E-mail: silvicarrillo3@hotmail.com, rexprimero@hotmail.com. Tel: (55) 54 87 09 00, Ext. 2820. Fax: (55) 56 55 10 76.

egg that has not been submitted to any preservation processes, whose physical characteristics and chemical and microbiological properties are maintained at an optimal level of edible quality, and whose age since laying is no greater than 15 days; included in this classification are products stored in refrigerators for periods no longer than 10 days (NOM-159-SSA1-1996; NOM-FF-079-SCFI-2004).

Many studies have been conducted (Marshall and Van Elswyk 1994; Van Elswyk et al., 1995, 1997; Castillo-Badillo et al., 2005) in which laying hen diet were supplemented with fish oil in order to increase the n3 PUFAs content of their eggs (1.02% ALA, 15.54% EPA and 10.70% DHA / percent of total fatty acids). Although the results have been satisfactory, one drawback has been that n3 PUFAs fast oxidize due to the long-chain hydrocarbons they contain, causing rancidity in the product and, as a result, reducing their shelf life.

Consequently, it has been considered appropriate to add antioxidants to fish oil-supplemented diet hens, with the goal of reducing the risk of lipid peroxidation. The most commonly used antioxidant is vitamin E (VE) (Chen et al., 1998; Cherian et al., 1996).

Due to the fact that these FAs are highly prone to oxidation, VE reserves are rapidly exhausted when dietary EPA and DHA quantities are increased (Surai and Spark, 2000; Surai, 2003). It has been suggested that increasing the quantity of vitamin E in rations supplemented with fish oil (FO) might help to prevent or reduce undesirable effects in the hens and to avoid the loss of long-chain fatty acids by reducing the risk of lipid peroxidation (Meluzzi et al., 2000; Surai, 2003).

However, an association among dietary FO and reduced sensory quality of eggs has been reported (Van Elswyk et al., 1995; Marshall and Van Elswyk, 1994; Van Elswyk, 1997; González-Esquerra and Leeson, 2000; Castillo-Badillo et al., 2005). These modifications, off-flavors and, their lipid instability, have been associated to the inclusion of FO in the formulation of the diet hens. Lipids are not the only substances responsible for fishy flavors; it might also be a non-lipid fraction that, interacting with some lipid compounds, produces those fishy flavors. For example, amines can impart a fishy taint (González-Esquerra and Leeson, 2001; Honkatukia et al., 2005). Also, oxidation products could be responsible in part for fishy odors found in eggs, but the use of stabilized n3 FA sources in poultry diets could in theory diminish this problem (Van Elswyk et al., 1995; Cherian et al., 1996; Leskanich and Noble, 1997).

The aim of this study was to know the effect of adding high levels of VE (100 and 200 mg/kg) to diets supplemented with sardine oil (SO) on the egg FA profile.

MATERIALS AND METHODS

Sources of sardine oil and vitamin E

Sardine oil (SO) used was obtained from Guaymas, Sonora,

Mexico. The SO was not refined, bleached, and deodorized, with a Butylated Hydroxytoluene (BHT) as an antioxidant. The VE was feed-grade and supplied by BASF Mexicana (Lutavit E 50%).

Diet formulation and preparation

Four diets were prepared: T1- basal diet (BD), T2-BD+2.5% SO, T3-BD+2.5% SO+100 mg/kg VE, and T4-BD+2.5% SO+200 mg/kg VE. Diets were formulated using Nutrition Windows™ (version 5.0 pro) software to contain 15% crude protein and 2800 kcal of metabolizable energy and other nutrients to meet the nutrient requirements established by the National Research Council (1994) for laying hens (Table 1). Diets were prepared weekly. The fatty acid compositions of the soy and sardine oils and the diets used in this study were measured using gas chromatography following AOAC method 969.33 (AOAC, 2000).

Experimental design

240 Bovans White hens were randomly assigned to four treatments with five replicates of 12 birds each. Each replicate represented one experimental unit. The experimental diets were randomly assigned to the groups of hens. After one week of adaptation, the trial was carried out for four weeks. Throughout the period, the productive parameters were measured: feed intake, egg production, egg weight, egg mass, and feed conversion ratio. To measure the yolk color, 50 eggs per treatment (10 per replicate) were randomly collected at end of the four weeks. The color was measured by Roche color fan. The study was conducted in accordance with the policies established by the Ethics Committee for Animal Care of the Faculty of Veterinary Medicine and Animal husbandry, National Autonomous University of Mexico. After four weeks, 50 eggs per treatment (10 per replicate) were randomly collected. The yolks from each replicate were mixed to form a pooled sample. Each pooled sample was analyzed by duplicate. The lipids were extracted using chloroform: ethanol (1:1) (method 923.07). The lipid extract was methylated with boron trifluoride in a methanolic solution (method 969.33) (AOAC, 2000). The samples were injected in a Varian gas chromatograph (model 3380 CX) equipped with a CP8400 autosampler, flame ionization detector, and a 30 m DB23 column with an internal diameter of 0.25 mm. The miristoleic acid was used as internal standard. The nitrogen was used as the carrier gas with a flow rate of 30 ml/min. The temperatures used were: column, 230°C; injector, 150°C; and detector, 300°C. To calculate FA concentration, a mix of FA standards with known concentrations (Supelco™ 37 FAME Mix SIGMA) was used as reference. The results were analyzed using Star Chromatography Workstation v. 6.3 software from Varian Associates, Inc., and are reported as percentages of total FA (%TFA).

Organoleptic test

At the end of the 4th week, 30 untrained panelists, who were usual egg consumers participated in organoleptic test. This test was performed in single booths and under white light, in the Organoleptic Evaluation Laboratory. A hedonic acceptance test was used (Watts et al., 1992). Four samples of fried eggs, one for each treatment, labeled with random numbers, were provided to the panelists. Salt was not added. They received a questionnaire to indicate the degree of acceptance of each sample choosing from the following options: "like very much", "like moderately", "neither like nor dislike", "dislike moderately" and "dislike very much". They also received bread and water to be consumed before testing each sample in order to eliminate any residual flavor brown color, and translucent. It was stabilized with 200 ppm of Butylated

Table 1. Compositions of experimental diets (%).

Ingredient	T1
Sorghum grain	62.67
Soybean meal	20.71
Calcium carbonate	9.85
Sardine oil	0.00
Soy oil	4.50
Orthophosphate *	1.39
Salt	0.40
Vitamin premix †	0.10
Vitamin E ‡	0.00
Avelut §	0.10
DL-Methionine	0.07
Choline chloride 60	0.05
Mineral premix ¶	0.05
Avired **	0.05
Antioxidant	0.04
Antimicrobial	0.02
L-Threonine	0.00
Total	100.00

*Monobasic phosphate. P 21% min, Ca 18% min, F 0.21% max, moisture 5% max. † Vitamins (per kg): A, 10 000 000 IU; D₃, 3 000 000 IU; E, 20 000 IU; K₃, 2.500 g; Thiamin, 2.500 g; Riboflavin, 5 g; Niacin, 35 g; Pantothenic acid, 10 g; Pyridoxine, 4 g; Folic acid, 1 g; Cyanocobalamin, 10 mg; Biotin, 200 mg; excipient, q.s. 1 000. ‡Lutavit 50 (BASF Mexicana SA de CV). § Source of natural yellow xanthophylls (marigold flower), 15 g/kg. ¶ Minerals (mg/kg in diet): Mn 120; Zn 100; Fe 120; Cu 12; I 0.7; Se 0.4; Co 0.2; excipient, c.b.p. 1 000. **Red vegetal pigment: Lucantin Red as a source of canthaxanthin, 5 g total carotenoids/kg.

Hydroxytoluene (BHT) as an antioxidant. The VE was feed-grade and supplied by BASF Mexicana (Lutavit E 50%).

Statistical analysis

The productive parameters variables and FA concentrations were subjected to an analysis of variance with a fully randomized design using PROC ANOVA in the SAS software package. Tukey's test was used to compare means ($P < 0.05$) (SAS v.6.12).

RESULTS

Eggs fatty-acid composition

The sardine oil used in this study had a greater content of EPA (14%) than DHA (10%) (Table 2). As a consequence, the FA compositions of diets that included SO showed similar proportions: more EPA (8%) than DHA (6%). Moreover, the addition of SO to laying hen diets also resulted in higher saturated FA (SFA) content than in control diet (Table 3). However, more DHA than EPA was deposited in the eggs (Table 4). Productive parameters were not affected by supplementation with 2.5% SO ($P > 0.05$) (Table 5). No difference ($P > 0.05$) were found in the egg flavor, among the four treatments.

DISCUSSION

Fatty-acid composition of eggs

The results of fatty acid composition of oils used in diet formulation, agrees with the data obtained by Cachaldora et al. (2006), who indicated that the proportion of these two fatty acids in fish oil varies by species; in anchovy oil, the EPA concentration is greater than the DHA concentration (approximately 185 vs. 85 g/kg), while the opposite relationship exists in tuna oil (approximately 80 g/kg EPA vs. 220 g/kg DHA).

The behavior of the fatty acid composition of the diet and content in eggs, may be related to the fact that in hens, as in mammals, EPA is converted to DHA and vice-versa through lipid metabolism as a result of elongation and desaturation processes, with a preference for DHA deposition (González-Esquerra and Leeson, 2001; Cachaldora et al., 2006). These results agree with the observations of other authors using menhaden oil (Huang et al., 1990; Van Elswyk et al., 1995; González-Esquerra and Leeson, 2000) and tuna oil (Castillo-Badillo et al., 2005).

The fatty-acid composition of the eggs obtained from each treatment is shown in Table 4. In all treatments, saturated fatty acids with least of 13 carbons, and

Table 2. Fatty-acid composition of oils used in diet formulation.

Fatty acid (Percentage FAME)	Soy oil	Sardine oil
Myristic (C14:0)	0.11	6.09
Palmitic (C16:0)	10.77	18.54
Palmitelaidic (C16:1)	0.00	0.13
Palmitoleic (C16:1)	0.18	7.47
Heptadecanoic (C17:0)	0.10	0.56
Cis-10-heptadecanoic (C17:1)	0.07	0.99
Stearic (C18:0)	4.22	3.82
Oleic (C18:1 n9)	21.91	12.20
Cis-vaccenico	0.83	3.06
Linoleic (C18:2 n6 LA)	53.23	13.70
Gamma linolenic (C18:3 n6 GLA)	0.06	0.31
Alpha linolenic (C18:3 n3 ALA)	6.95	0.99
CLA c9,t11 y c11, t9 (C18:2)	0.00	2.55
CLA t10, c12 (C18:2)	0.00	0.29
Arachidic (C20:0)	0.31	0.29
Eicosenoic (C20:1)	0.22	2.17
Cis-11,14-eicosenoic (C20:2)	0.05	0.25
Cis-11,14,17-eicosenoic (C20:3)	0.10	0.18
Arachidonic (C20:4 n6 AA)	0.00	0.75
Eicosapentaenoic (C20:5 n3 EPA)	0.40	14.20
Docosapentaenoic (C22:5 n3 DPA)	0.00	1.57
Docosahexaenoic (C22:6 n3 DHA)	0.00	10.26
Total	99.51	100.37

FAME – Fatty acids methyl esters.

elaidic, behenic, erucic, lignoceric and nervonic acids were not detected. Trace amounts ranging from 0.05 to 1 g/100 g FAME of 14:0, 14:1, 16:1, 17:0, 17:1, 18:2 (CLA and linolelaidico), 18:3 (gama linolenico), 20:0, 20:2, 20:3, 20:5, 22:0, 22:5 and 23:0, were present in treatments containing SO.

Adding SO to the diet resulted in a significant increase ($P < 0.05$) in the myristic acid (C14:0), palmitic acid (C16:0), palmitoleic (C16:1), eicosapentaenoic acid (C20:5 n3EPA), docosapentaenoic acid (C22:5 n3 DPA), and docosahexaenoic acid (C22:6 n3 DHA) content in eggs ($P < 0.05$); while that the concentration of oleic (C18:1 n9), linoleic (C18:2 n6 LA), alpha-linolenic (C18:3n3) and arachidonic (C20:4 n6 AA) acids were reduced.

The total SFA content in the eggs increased when diets were supplemented with SO, while that the monounsaturated fatty acids (MUFA) content and polyunsaturated acids (PUFA) did decrease significantly ($P < 0.05$). The total quantity of n3FA increased, whereas the total quantity of n6FA significantly decreased ($P < 0.05$). The calculation of the ratio n6:n3 was performed as follows:

$$\Sigma n6 / \Sigma n3 : \Sigma n3 / \Sigma n3$$

Eggs treated with SO maintained an n6:n3 ratio of 2:1 vs. 11:1 for the control group ($P < 0.05$). These observations agree with the findings of Hargis et al. (1991), who supplemented hen diets with 3% menhaden oil. These authors found a significant increase in n3 and a decrease in n6, resulting in an n6:n3 ratio of 3:1. They also observed that MUFA content did decline, mainly oleic acid content, but in their study SFA content was not influenced by the diet.

The increase of n3FA in eggs accompanied by a noticeable decrease in n6 concentration when diets are supplemented with 2.5% SO occurs because Δ^6 -desaturase delta-6 is more active in the n3 pathway than in the n-6 pathway (Meluzzi et al., 2000; Castillo-Badillo et al., 2005). However, maintaining an appropriate n6:n3 ratio in the diet, and in the birds, is more important than the total concentrations of these fatty-acid types because the n6:n3 ratio determines membrane composition and, consequently, the types and quantities of eicosanoids that are produced. For example, high n6:n3 ratios are pro-inflammatory, and low ratios are anti-inflammatory (Klasing, 1998).

With regard to the benefits on n3FA when VE is added to diets supplemented with SO, we observed only a higher content of EPA and DPA in eggs when 100 mg/kg VE

Table 3. Fatty-acid compositions of diets (Percentage fatty acids methyl esters).

Fatty acid	T1	T2	T3	T4
Myristic (C14:0)	0.24	3.46	3.60	3.68
Palmitic (C16:0)	13.03	17.01	16.80	17.38
Palmitelaidic (C16:1)	0.08	0.10	0.09	0.08
Palmitoleic (C16:1)	0.44	4.11	4.12	4.13
Heptadecanoic (C17:0)	0.12	0.35	0.36	0.37
cis10-heptadecanoic (C17:1)	0.07	0.29	0.35	0.54
Stearic (C18:0)	3.86	3.27	3.09	3.09
Oleic (C18:1)	27.78	20.41	20.35	20.54
cis-vaccenic (C18:1)	0.72	2.23	2.22	2.21
Linoleic (LA) (C18:2)	43.71	20.36	21.89	21.92
Gama-linolenic (C18:3)	0.00	0.14	0.15	0.13
Alpha-linolenic (ALA) (C18:3 n3)	4.54	1.60	1.57	1.61
CLA c9, t11 and c11, t9 (C18:2)	0.00	1.33	1.36	1.35
CLA t10, c12 (C18:2)	0.00	0.09	0.12	0.10
Arachidic (C20:0)	0.26	0.22	0.22	0.23
Eicosenoic (C20:1)	0.28	1.32	1.15	1.44
cis-11,14-eicosadienoic (C20:2)	0.04	0.11	0.10	0.10
cis-11,14,17eicosatrienoic (C20:3)	0.04	0.06	0.04	0.00
Arachidonic (AA) (C20:4)	0.19	0.45	0.41	0.41
Eicosapentaenoic (EPA) (C20:5 n3)	0.15	8.05	8.07	7.93
Docosapentaenoic (C22:5 DPA n6)	0.00	0.16	0.16	0.15
Docosapentaenoic (C22:5 DPA n3)	0.00	1.08	1.07	1.07
Docosahexaenoic (DHA) (C22:6 n3)	0.07	6.11	6.05	5.91
Other fatty acids	4.46	7.69	6.66	5.71
Total	100.00	100.00	100.00	100.00

T1- basal diet (BD), T2- BD+2.5% SO, T3- BD+2.5% SO+100 mg/kg vitamin E, T4- BD+2.5% SO+200 mg/kg vitamin E.

was added to diets supplemented with SO (T3 vs. T2; $P > 0.05$), but DHA no change (Table 4). These results agree with the findings of Meluzzi et al. (2000), who found no effect on the FA composition of eggs when adding 50 or 100 mg/kg VE to diets supplemented with 3% FO. Some authors attributed the lack of an effect to the fact that eggs are highly resistant to lipid oxidation because they are closed systems containing natural antioxidants, such as VE, ovotransferrin, phosvitin, and carotenoids (Pike and Peng, 1985; Guérin-Dubiard et al., 2007).

The addition of 200 mg/kg VE to diets supplemented with 2.5% SO cause to noticeably decrease of palmitic acid (C16:0), palmitoleic (C16:1), n6FA (C18:2 and C20:4) and n3FA (C18:3, C20:5, C22:5, C22:6) in eggs, compared with the treatment containing 100 mg/kg VE ($P < 0.05$). These results agree with those of Meluzzi et al. (2000), who found that the n3 content of eggs decreased when 200 mg/kg VE was added to diets supplemented with 3% FO.

However, Qi and Sim (1998), found no effect on the FA content of eggs when high concentrations of VE (200, 400, and 800 mg/kg) were added to diets supplemented with 15% linseed oil + 0.5% FO. Similarly, Cherian et al.

(1996) have reported that diets containing 3.5% FO and 367 to 423 $\mu\text{g/g}$ VE do not affect FA composition.

Some studies have shown that under certain situations, VE can act as a prooxidant rather than as an antioxidant. Chen et al. (1998) have proposed that VE acts as a prooxidant in yolks when its concentration reaches 120 ppm or more in the diet. Franchini et al. (2002) have indicated that high VE concentrations (100 to 200 mg/kg) in diets increase the content of malonaldehyde in eggs. A possible mechanism for this process is described subsequently.

The oxidative process consists of three stages: initiation, propagation, and finalization. During initiation, high concentrations of free radicals are generated, and the generation of peroxides remains low. The free radical is in the carbon atom close to the double bond, creating an alkene radical. This reaction is generated in molecules with numerous unsaturated carbons. Thus, susceptibility to oxidation declines from high to low for DHA, DPA, EPA, arachidonic (AA), ALA, LA, and oleic acids. Antioxidants such as tocopherols act during the initiation stage, slowing the generation of free radicals (Wong, 1989).

In the case of VE, its antioxidant effect begins when the

Table 4. Fatty-acid content in eggs from hens fed diets including fish oil and different levels of vitamin E.

Fatty acids (Percentage TFA)	T1	T2	T3	T4
Myristic (C14:0)	0.34 ± 0.02 ^b	0.48 ± 0.02 ^a	0.48 ± 0.01 ^a	0.47 ± 0.02 ^a
Palmitic (C16:0)	24.62 ± 0.20 ^d	26.90 ± 0.24 ^a	25.78 ± 0.14 ^b	25.22 ± 0.38 ^c
Palmitoleic (C16:1)	2.33 ± 0.05 ^d	3.61 ± 0.11 ^a	3.24 ± 0.03 ^b	2.85 ± 0.08 ^c
Palmitelaidic (C16:1)	0.54 ± 0.01 ^a	0.54 ± 0.01 ^a	0.56 ± 0.05 ^a	0.56 ± 0.03 ^a
Stearic (C18:0)	8.57 ± 0.09 ^a	8.45 ± 0.40 ^a	8.29 ± 0.04 ^a	8.45 ± 0.18 ^a
Oleic (C18:1 n9)	40.90 ± 0.41 ^a	37.34 ± 0.71 ^b	37.44 ± 0.42 ^b	37.84 ± 0.65 ^b
Cis-vaccenic (C18:1)	0.75 ± 0.12 ^b	1.73 ± 0.18 ^a	1.69 ± 0.17 ^a	1.62 ± 0.18 ^a
Linoleic (C18:2 n6)	15.95 ± 0.13 ^a	9.46 ± 0.11 ^b	8.95 ± 0.13 ^c	7.83 ± 0.14 ^d
Alpha-linolenic (C18:3 n3)	0.65 ± 0.01 ^a	0.37 ± 0.01 ^b	0.33 ± 0.01 ^c	0.28 ± 0.02 ^d
Arachidonic (C20:0 n6)	1.82 ± 0.07 ^a	0.65 ± 0.03 ^b	0.69 ± 0.05 ^b	0.56 ± 0.02 ^c
Eicosapentaenoic (C20:5 n3)	0.02 ± 0.00 ^d	0.41 ± 0.02 ^b	0.50 ± 0.02 ^a	0.23 ± 0.02 ^c
Docosapentaenoic (C22:5 n3)	0.11 ± 0.01 ^d	0.35 ± 0.01 ^b	0.43 ± 0.03 ^a	0.22 ± 0.02 ^c
Docosahexaenoic (C22:6 n3)	0.84 ± 0.09 ^c	3.12 ± 0.33 ^a	3.17 ± 0.16 ^a	2.47 ± 0.13 ^b
Saturated fatty acids	33.53 ± 0.31 ^d	35.44 ± 0.52 ^a	34.56 ± 0.19 ^b	34.11 ± 0.60 ^c
Monounsaturated fatty acids	44.52 ± 0.60 ^a	43.12 ± 1.01 ^b	42.92 ± 0.66 ^b	42.67 ± 0.93 ^b
Polyunsaturated fatty acids	19.40 ± 0.13 ^a	14.37 ± 0.30 ^b	14.06 ± 0.22 ^c	11.59 ± 0.20 ^d
Total n6	17.77 ± 0.10 ^a	10.11 ± 0.09 ^b	9.63 ± 0.15 ^c	8.39 ± 0.14 ^d
Total n3	1.62 ± 0.09 ^c	4.26 ± 0.35 ^a	4.43 ± 0.16 ^a	3.20 ± 0.15 ^b
n6:n3	10.98 ± 0.63 ^a	2.40 ± 0.24 ^{cb}	2.18 ± 0.09 ^c	2.63 ± 0.13 ^b

Different letters within rows indicated statistical differences ($P < 0.05$). T1 = basal diet (BD), T2 = BD + 2.5% SO, T3= BD + 2.5% SO + 100 mg/kg vitamin E, T4= BD + 2.5% SO + 200 mg/kg vitamin E.

Table 5. Productive parameters for hens fed diets including sardine oil and different levels of vitamin E.

Parameter	Feed intake g/hen/day	Egg production (%)	Egg weight (g)	Egg mass (g)	Feed conversion ratio	Yolk color Roche fan color
BD	114.95 ± 6.88	83.70 ± 8.03	71.95 ± 2.20	56.45 ± 6.33	2.07 ± 0.21	8.74 ± 1.11 ^b
BD + 2.5% SO	117.90 ± 5.91	81.45 ± 8.36	70.45 ± 2.58	56.95 ± 6.10	2.10 ± 0.22	9.60 ± 1.24 ^a
BD + 2.5% SO + 100 mg/kg VE	118.50 ± 4.26	80.95 ± 7.74	70.75 ± 2.38	57.65 ± 5.58	2.02 ± 0.20	9.72 ± 1.29 ^a
BD + 2.5% SO + 200 mg/kg VE	115.70 ± 5.35	80.45 ± 6.64	71.80 ± 2.48	57.20 ± 4.97	2.01 ± 0.14	9.62 ± 1.28 ^a

a,b In each column, different letter indicate statistical difference ($P < 0.05$).

hydrogen of the aromatic ring of VE is released, generating two free radicals, hydrogen,

and a α -tocopherol radical. The tocopherol radical can react with one of the peroxy radicals that

come from the fatty acid and can form radical products derived from quinone, α -

tocopherolquinone, and quinone epoxide, which do not have the do not have the antioxidant activity of VE. Therefore, the activities of other antioxidants, such as vitamin C, are important to restore or regenerate VE from the tocopherol radical so that it can recover its antioxidant function (Wong, 1989). Regeneration of the tocopherol radical occurs in the presence of any antioxidant that releases hydrogen radicals without turning into a reactive oxygen species in the process. For example, vitamin C is a powerful antioxidant that turns into dehydroascorbic acid when donating hydrogen (Li and Min, 2006). However, this possibility remains to be assessed in laying hens, which metabolize vitamin C but do not transfer it to their eggs (Pardue and Thaxton, 1986). Therefore, we should look for another antioxidant that, like ascorbic acid, would help VE to regenerate and recover its antioxidant activity to protect the n3FA present in the eggs. Further studies are needed to test this hypothesis.

Productive parameters

These results agree with those of Cornejo et al. (2008) and Cherian et al. (2006), who detected no changes in productive parameters when incorporating 6% FO or 0.25 and 0.5% FO, respectively. Likewise, Cachaldora et al. (2006) no found effect on egg weight when hen diets were supplemented with various types and levels of FO (1.5, 3, 4.5, and 6%).

Although egg weight was not affected ($P>0.05$), a numerical decrease was observed when SO and VE were added in laying hen diets. Whitehead (1995) reported that egg weight was affected by fat type and amount. High level of FO gave a decrease in egg weight with regard to the control group. That decrease caused by fish oil was caused by a decrease in yolk weight. These decreases by FO were mediated through a common mechanism involving oestradiol. Oestradiol regulate hepatic synthesis of triglyceride and very low density lipoprotein apolipoprotein as well as albumen synthesis in the oviduct. Fatty acids with a chain length of 18 carbon atoms with moderate degree of unsaturation would appear to be most effective in enhancing oestrogen metabolism, but the presence of some other compound in the dietary fats also affect oestrogen metabolism cannot be omitted.

Thus, the oestrogen has a great influence on egg weight as dietary. Similarly, adding VE to diets supplemented with SO had no effect on production variables in our study, this is consistent with the observations of Meluzzi et al. (2000) who observed no effect on productive parameters in hens supplied with diets containing 3% FO and three levels of VE (50, 100, and 200 mg/kg).

The egg yolk color increased when diets were supplemented with SO. The SO employed in this study was a by-product of the fish industry. The increase of the

yolk color could be due the pigments present in the SO.

Organoleptic test

The results suggest that SO could be used in the laying hen rations until 2.5%, because the panelists did not detect fish flavor in eggs.

Conclusion

Under the conditions of this study, (1) adding 2.5% SO to the diet of laying hens is an alternative method to enrich eggs with n3FA without affecting productive parameters; (2) adding large quantities (100 or 200 mg/kg) of VE to diets supplemented with SO did not protect the PUFAs.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) for the fellowship to the first author, at the TAMU-CONACyT program for partially funding this study, and BASF Mexicana for the donation of the vitamin E used in this study. This article is part of the first author's doctoral thesis.

REFERENCES

- AOAC (2000). Official Methods of Analysis. 17th ed. Association of Official Analytical Chemists. Washington D.C.
- Baucells M, Crespo N, Barroeta A, López-Ferrer S, Grashorn M (2000). Incorporation of different polyunsaturated fatty acids into eggs. *Poult Sci.*, 79: 51-59.
- Cachaldora P, Garcia-Rebollar P, Álvarez C, De Blas J, Méndez J (2006). Effect of type and level of fish oil supplementation on yolk fat composition and n-3 fatty acids retention efficiency in laying hens. *Br. Poult. Sci.*, 47: 43-49.
- Castillo-Badillo C, Vázquez-Valladolid J, González-Alcorta M, Morales-Barrera E, Castillo-Domínguez R, Carrillo-Domínguez S (2005). The tuna oil as w-3 fatty acids source for egg of laying hens. *Grasas y Aceites*. 56: 153-159.
- Chen J, Latshaw I, Lee H, Min D (1998). Alpha-tocopherol content and oxidative stability of egg yolk as related to dietary alpha-tocopherol. *J. Food Sci.*, 63: 919-922.
- Cherian G, Wolfe F, Sim J (1996). Dietary oils with added tocopherols: effects on egg or tissue tocopherols, fatty acids, and oxidative stability. *Poult. Sci.*, 75: 423-431.
- Cornejo S, Hidalgo H, Araya J, Pokniak J (2008). Supplementation of commercial layer diets with different refined fish oils. Effects on layer performance and sensory egg quality. *Arch. Med. Vet.* 40: 45-50.
- FAO (2003) Nutrition Country Profiles. "Organization of the United Nations Food and Agriculture", Rome, Italy.
- Franchini A, Sirri F, Tallarico N, Minelli G, Iaffaldano N, Meluzzi A (2002). Oxidative stability and sensory and functional properties of eggs from laying hens fed supranutritional doses of vitamin E and C. *Poult. Sci.*, 81: 1744-1750.
- González-Esquerria R, Leeson S (2000). Effect of feeding hens regular or deodorized menhaden oil on production parameters, yolk fatty acid profile, and sensory evaluation of eggs. *Poult. Sci.* 79: 1597-1602.
- González-Esquerria R, Leeson S (2001). Alternatives for enrichment of eggs and chicken meat with omega-3 fatty acids. *Can. J. Anim. Sci.*, 81: 295-305.

- Guérin-Dubiard C, Castellani O, Anton M (2007). Egg compounds with antioxidant and mineral binding properties. In: Huopalahti R, López-Fandiño R, Anton M, Schade R (eds.), *Bioactive Egg Compound*, Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, pp. 223-228.
- Hargis P, Van Elswyk M, Hargis B (1991). Dietary modification of yolk lipid with menhaden oil. *Poult. Sci.*, 70: 874-883.
- Honkatukia M, Reese K, Presinger R, Tuiskula-Haavisto M, Weigend S, Roito J, Maki-Tanila A, Vilkki J (2005). Fishy taint in chicken eggs is associated with a substitution within a conserved motif of the *FMO3* gene. *Genomics* 86: 225-232.
- Huang Z, Leibovitz H, Lee C, Miller R (1990). Effect of dietary fish oil on w-3 fatty acid levels and general performance of commercial broilers fed practical levels of redfish meal. *Poult. Sci.*, 68: 153-162.
- Klasing K (1998). *Comparative Avian Nutrition*, CAB International, Cambridge, U.K.
- Kris-Etherton M, Williams D, Harris S, Lawrence A (2002). Fish consumption, fish oil, omega 3 fatty acids, and cardiovascular disease. *Circulation*. 106: 2747-2757.
- Leskanich O, Noble C (1997). Manipulation of the n-3 polyunsaturated fatty acid composition of avian eggs and meat. *J. Food Sci.*, 54: 1457-1460.
- Li J, Min D (2006). Nutraceuticals aging and food oxidation. In: Akoh C (ed.), *Handbook of Functional Lipids* Boca Raton, USA: CRC Press, pp. 325-350.
- Marshall C, Van Elswyk E (1994). Oxidative stability and sensory quality of stored eggs from hens fed 1.5% menhaden oil. *J. Food Sci.*, 59: 261-263.
- Meluzzi A, Sirri F, Manfreda G, Tallarico N, Franchini A (2000). Effects of Dietary vitamin E on the quality of table eggs enriched with n3 long-chain fatty acids. *Poult. Sci.*, 79: 539-545.
- National Research Council (1994). *Nutrient Requirement of Poultry*. 9th rev. ed. Natl. Acad. Press, Washington, DC.
- NMX-FF-079-SCFI-2004. Mexican standards for poultry products. Fresh egg hen. Specifications and Test Methods. p. 23.
- NOM-159-SSA1-1996. Mexican Official Standard Goods and Services. Egg products and derivatives. Requirements and sanitary specifications. Mexico.
- Qi G, Sim J (1998). Natural tocopherol enrichment and its effect in n-3 fatty acid modified chicken eggs. *J. Agric. Food Chem.*, 46: 1920-1926.
- Pardue S, Thaxton P (1986). Ascorbic acid in poultry: A Review. *World's Poult. Sci. J.*, 42: 107-123.
- Pike O, Peng I (1985). Stability of shell egg and liquid yolk to lipid oxidation. *Poult. Sci.*, 64: 1470-1475.
- SAS Institute (2008). *SAS/STAT. User's Guide*. SAS Institute Inc., Cary, NC.
- Simopoulos P (2000). Human requirement for n-3 polyunsaturated fatty acids. *Poult. Sci.*, 79: 961-970.
- Surai P, Sparks N (2000). Tissue-Specific and alpha-tocopherol profiles in male chickens depending on dietary tuna oil and vitamin E provision. *Poult. Sci.*, 79: 1132-1142.
- Surai P (2003). *Natural antioxidants in avian nutrition and reproduction*. Nottingham University Press, England.
- UNA (2010). *Digest of Poultry Sector Economic Indicators "National Poultry Union*, Mexico City. p. 105.
- Van Elswyk M, Dawson P, Sams A (1995). Dietary menhaden oil influences sensory characteristics and headspace volatiles of shell eggs. *J. Food Sci.*, 60: 85-89.
- Van Elswyk M (1997). Comparison of n-3 fatty acids sources in laying hen rations for improvement of whole egg nutritional quality: a review. *Br. J. Nutr.*, 78(Suppl 1): S61-S69.
- Watts BG, Ylimaki L, Jeffery Y, Elías L (1992). *Basic methods for the evaluation of foods*. International Center for Development Research, Ottawa, Canada. p.171.
- Whitehead C (1995) Plasma oestrogen and the regulation of egg weight in laying hens by dietary fats. *Anim. Feed Sci. Technol.*, 53: 91-98.
- Wong DW (1989). *Food Chemistry* Acirbia, Zaragoza, Spain.

Modificación en la composición de ácidos grasos del huevo al incluir aceite de sardina y ácido linoleico conjugado en dietas para gallinas ponedoras[#]

Modulation in egg fatty acids composition when laying hens diets are supplemented with sardine oil and conjugated linoleic acid

S Carrillo^{a,b*}, E Ávila^a, C Vásquez^a, C Calvo^b, ME Carranco^b, F Pérez-Gil^b

^aFacultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Nacional Autónoma de México, México.

^bDepartamento de Nutrición Animal del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán, México.

SUMMARY

The regular intake of omega 3 fatty acids (C18:3 ALA, C20:5 EPA, C22:6 DHA) and conjugated linoleic acid (C18:2 CLA) is currently recommended due to their importance in the prevention and control of cardiovascular diseases, diabetes and several types of cancer. The aim of this study was to determine the effect of supplementing laying hens diets with sardine oil and CLA on egg fatty acid composition. 240 Bovans White hens were randomly distributed into four treatments with 5 replicates of 12 hens each one. The treatments consisted in a control diet (T1), T1 plus 2.5% of sardine oil (T2), and T2 padded with 1% and 2% of CLA (T3 and T4 respectively). The experimental trial was carried out during four weeks. At the end of that period, 50 eggs from each treatment were taken to determine fatty acids through gas chromatography. As opposed to the control treatment, the results showed an increase in omega 3 fatty acid (6.0% vs 1.6% total fatty acids) and CLA (3-5% vs 0.7% total fatty acids) concentration in eggs, and n6:n3 ratio of 1.3:1 vs 11:1, observed in T2, T3 and T4 ($P < 0.05$). It is concluded that supplementation of laying hen diets with sardine oil and CLA makes it possible to produce eggs with a double added value.

Palabras clave: ácido linoleico conjugado, aceite de sardina, huevo, ácidos grasos omega tres.

Key words: conjugated linoleic acid, sardine oil, eggs, omega 3 fatty acids.

INTRODUCCIÓN

Actualmente las enfermedades cardiovasculares, la diabetes y diferentes tipos de cánceres se han convertido en las principales causas de mortalidad en muchos países de occidente. Sin embargo, se ha observado que consumir en forma regular los ácidos grasos omega 3 (AGn3), eicosapentaenoico (C20:5 n3 EPA) y docosahexaenoico (C22:6 n3 DHA) puede no solo ser de gran utilidad en la prevención y control de estas enfermedades, sino también proporcionar otros beneficios a la salud (Holub 2002). De ahí el interés de muchos investigadores por buscar ingredientes útiles para enriquecer con AGn3 alimentos de fácil consumo y bajo costo, como el huevo de gallina. Los aceites de pescado han resultado ser uno de los ingredientes más aceptados para lograr tal fin, ya que tienen un alto contenido de EPA y DHA (Hargis y col 1991, Castillo-Badillo y col 2005, Cachaldora y col 2006). Diversos estudios han demostrado la efectividad en el uso de estos aceites marinos en la ración, ya que sus AGn3 son depositados en la yema, existiendo la recomendación de no usar niveles

superiores al 3% de la ración a fin de no afectar negativamente el sabor del huevo ni las variables productivas de las aves (Hargis y col 1991, González-Esquerria y Leeson 2000, 2001, Cherian 2008, Kralik y col 2008).

Por otra parte, en los últimos años el uso del ácido linoleico conjugado (CLA) en la dieta para las aves ha cobrado mucho interés en virtud de los múltiples beneficios a la salud que este también ofrece. Sus isómeros más abundantes son el 18:2 Δ cis9, *trans* 11 y el 18:2 Δ trans10, *cis* 12. Se sabe que el CLA tiene efecto hipocolesterolémico, hipotriglicéridémico y antiaterogénico. En el sistema inmune ejerce una estimulación en la síntesis de IgA, IgG, IgM y una disminución significativa en los niveles de IgE, por lo que se le considera como potencialmente efectivo en la prevención y tratamiento de alergias alimentarias. Su acción sobre el cáncer mamario parece ser el más significativo, aunque también su participación en la reducción del peso corporal ha cobrado gran interés en los últimos años (Pariza y Ha 1990, Ip 1997, Sanhueza y col 2002). Ante esta información el interés por incrementar el aporte de CLA en el huevo ha ido en aumento. Suksombat y col (2006) realizaron un ensayo en el que suministraron 0, 1, 2, 3 y 4% de CLA en la dieta de gallinas ponedoras y observaron que con 4% el consumo de alimento, el peso del huevo, del albumen y de la yema se redujeron significativamente ($P < 0,05$); lo mismo que el color de la yema, la concentración de ácidos grasos monoinsaturados (AGM) y la de los poliinsaturados (AGPI). Algunos autores sugieren

Acceptado: 10.07.2012.

[#] Financiado por Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), México.

* Vasco de Quiroga N° 15, 14000 México D.F.; silvicarrillo3@hotmail.com

que suministrar en forma combinada CLA con aceite de pescado u otro tipo de grasa puede corregir estos efectos (Du y col 2000, Cherian y col 2002, Álvarez y col 2004, Kim y col 2007).

El objetivo de este estudio fue determinar el efecto que sobre la composición en ácidos grasos del huevo y variables productivas del ave tiene suplementar la dieta de las gallinas con 2,5% de aceite de sardina (AS) más 1% y 2% de CLA.

MATERIAL Y MÉTODOS

OBTENCIÓN DEL ACEITE DE PESCADO Y DEL CLA

El aceite de sardina (AS) empleado en el estudio provenía de Guaymas, Sonora, México, era no deodorizado y estaba estabilizado con 200 ppm de butilhidroxitolueno (BHT) como antioxidante. La composición en ácidos grasos de este aceite se determinó por cromatografía de gases, siguiendo el método de la AOAC (2000) (método 969.33) (cuadro 1). El CLA utilizado fue Lutrell® Pure granulado

Cuadro 1. Composición en ácidos grasos de los aceites utilizados en las dietas.

Fatty acids composition of oils used in the diets.

Ácido graso (%TAG)	Aceite de soya	Aceite de pescado
Mirístico (C14:0)	0,11	6,09
Palmítico (C16:0)	10,77	18,54
Palmitelaídico (C16:1)	0,00	0,13
Palmitoleico (C16:1)	0,18	7,47
Heptadecanoico (C17:0)	0,10	0,56
Cis-10-heptadecanoico (C17:1)	0,07	0,99
Esteárico (C18:0)	4,22	3,82
Oleico (C18:1 n9)	21,91	12,20
Cis-vaccénico (C18:1)	0,83	3,06
Linoleico (C18:2 n6)	53,23	13,70
Gamma linoléico (C18:3 n6)	0,06	0,31
Alfa linoléico (C18:3 n3)	6,95	0,99
CLA c9,t11 y c11,t9 (C18:2)	0,00	2,55
CLA t10, c12 (C18:2)	0,00	0,29
Araquídico (C20:0)	0,31	0,29
Eicosenoico (C20:1)	0,22	2,17
Cis-11,14-eicosenoico (C20:2)	0,05	0,25
Cis-11,14,17-eicosenoico (C20:3)	0,10	0,18
Araquidónico (C20:4 n6)	0,00	0,75
Eicosapentaenoico (C20:5 n3)	0,40	14,20
Docosapentaenoico (C22:5 n3)	0,00	1,57
Docosahexaenoico (C22:6 n3)	0,00	10,26
Total	99,51	100,37

TAG: total de ácidos grasos; CLA: ácido linoleico conjugado.

(BASF), el cual contenía 20% de este compuesto conjugado (10% del isómero c9, t11 y 10% del isómero t10, c12).

FORMULACIÓN Y PREPARACIÓN DE LAS DIETAS

La dieta base (DB) (cuadro 2) se formuló con el programa Nutrion Windows® (Versión 5.0 Pro), cubriendo las necesidades nutrimentales establecidas para esta línea genética (CPI 2008), con 15% de proteína cruda y 2.785 kcal de energía metabolizable. La DB (T1) fue elaborada con base en sorgo-soya conteniendo 4,5% de aceite de soya. Otras tres dietas (T2, T3 y T4) fueron suplementadas con 2,5% de aceite de sardina (AS), sustituyendo parcialmente al aceite de soya y dos de estas dietas tenían además 1% y 2% de CLA (concentración alcanzada al preparar las dietas con el producto comercial que contenía 20% de CLA). Los tratamientos quedaron de la siguiente manera: T1-dieta-base (DB), T2-DB + 2,5% AS, T3-DB + 2,5% AS + 1% CLA y T4-DB + 2,5% AS + 2% CLA. Las dietas se prepararon cada semana, primero en una mezcladora de gusano sinfín con capacidad para 120 kg/5 minutos,

Cuadro 2. Composición de la dieta testigo (%).

Composition of control diet (%).

Ingrediente	%
Sorgo grano	62,67
Pasta de soya	20,71
Carbonato de calcio	9,85
Aceite de soya	4,50
Ortofosfato ¹	1,39
Sal yodada	0,40
Premezcla vitamínica ²	0,10
Avelut ³	0,10
DL-Metionina	0,07
Cloruro de colina 60	0,05
Premezcla mineral ⁴	0,05
Avired ⁵	0,05
Antioxidante	0,04
Antibiótico ⁶	0,02
Total	100,00

¹ Fosfato Monobásico. Fósforo 21% mínimo, Calcio 18% min, Flúor 0,21% max, Humedad 5% max.

² Vitaminas (por kg): A 10 000 000 UI, D₃ 3 000 000 UI, E 20 000 UI, K₃ 2.500 g, Tiamina 2.500 g, Riboflavina 5 g, Niacina 35 g, Ácido pantoténico 10 g, Piridoxina 4 g, Ácido fólico 1 g, Cianocobalamina 10 mg, Biotina 200 mg, excipiente cbp 1.000.

³ Fuente de xantofilas naturales amarillas (flor de cempazuchitl) 15 g/kg.

⁴ Minerales (mg/kg dieta): Manganeso 120, Zinc 100, Hierro 120, Cobre 12, Iodo 0,7, Selenio 0,4, Cobalto 0,2 excipiente cbp 1.000.

⁵ Pigmento vegetal rojo. Lucantin rojo (*Capsicum* sp). 5 g de carotenoides totales/kg.

⁶ Bacitracina.

y posteriormente en una de listón (Howes Co Inc model 152 M) por 3 minutos más a 75 rpm. El análisis de ácidos grasos de las dietas se realizó por cromatografía de gases (AOAC 2000 método 969.33) (cuadro 3).

ENSAYO EXPERIMENTAL

El ensayo tuvo lugar en el Centro Experimental de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia (UNAM), ubicado en Santiago, Zapotitlán, Delegación Tlahuac,

Distrito Federal. El clima de la región es templado sub-húmedo, con una precipitación anual de 747 mm, siendo enero el mes más frío y mayo el más caluroso. Se utilizaron 240 gallinas Bovans White de 75 semanas de edad, distribuidas al azar en cuatro tratamientos, con cinco réplicas de 12 aves cada una, constituyendo cada réplica la unidad experimental. A cada grupo de gallinas le fue asignada aleatoriamente una de las dietas experimentales. El ensayo tuvo una duración de cuatro semanas, con una semana previa de acostumbamiento y un programa de 16 horas

Cuadro 3. Composición en ácidos grasos de las dietas (% del total de ácidos grasos).
Fatty acid composition of the diets (% of total fatty acid).

Ácidos grasos	T1	T2	T3	T4
Láurico (C12:0)	0,13	0,10	0,08	0,06
Mirístico (C14:0)	0,24	3,46	2,42	1,66
Pentadecanoico (C15:1)	0,04	0,31	0,22	0,16
cis10-pentadecenoico (C15:1)	0,07	0,05	0,00	0,06
Palmítico (C16:0)	13,03	17,01	14,58	13,48
Palmitelaídico (C16:1)	0,08	0,10	0,00	0,07
Palmitoleico (C16:1)	0,44	4,11	2,67	1,89
Heptadecanoico (C17:0)	0,12	0,35	0,28	0,25
cis10-heptadecenoico (C17:1)	0,07	0,29	0,34	0,24
Esteárico (C18:0)	3,86	3,27	13,07	22,69
Oleico (C18:1 n9)	27,78	20,41	18,87	17,22
cis-vaccénico (C18:1)	0,72	2,23	1,61	1,20
Linoleico (C18:2 n6)	43,71	20,36	13,55	9,47
t9, t12, t15 (C18:2)	0,00	0,17	0,12	0,09
Gama-linolénico (C18:3 n6)	0,00	0,14	0,08	0,05
Alfa-linolénico (C18:3 n3)	4,54	1,60	1,05	0,69
CLA c9,t11 y c11,t9 (C18:2)	0,00	0,45	5,45	9,58
CLA t10,c12 (C18:2)	0,00	0,00	5,36	10,72
Araquídico (C20:0)	0,26	0,22	0,53	0,62
Eicosenoico (C20:1)	0,28	1,32	0,92	0,65
cis-11,14-eicosadienoico (C20:2)	0,04	0,11	0,08	0,05
cis-11,14,17eicosatrienoico (C20:3)	0,04	0,06	0,00	0,04
cis-8,11,14-eicatrienoico (C20:3)	0,04	0,23	0,00	0,12
Araquidónico (C20:4 n6)	0,19	0,45	0,25	0,18
Heneicosanoico (C21:0)	0,00	0,08	0,00	0,00
Behénico (C22:0)	0,17	0,07	0,00	0,00
Eicosapentaenoico (C20:5 n3)	0,30	8,05	5,45	3,77
Erúcico (C22:1)	0,11	0,16	0,63	0,39
Docosapentaenoico (C22:5 n6)	0,00	0,16	0,11	0,07
Lignocérico (C24:0)	0,12	0,08	0,12	0,12
Docosapentaenoico (C22:5 n3)	0,00	1,08	0,70	0,46
Docosahexaenoico (C22:6 n3)	0,07	6,11	3,89	2,57
Ácidos grasos saturados	17,93	24,64	31,08	38,88
Ácidos grasos monoinsaturados	29,59	28,97	25,26	21,87
Ácidos grasos poliinsaturados	48,93	38,97	36,09	37,86
Total CLA	0,00	0,45	10,81	20,30
Total AGn6	43,90	21,12	13,99	9,77
Total AGn3	4,91	16,83	11,10	7,49
n6:n3	9:1	1.3:1	1.3:1	1.3:1

T1-Dieta base (DB), T2-DB+2.5%AS, T3-DB+2.5%AS+1%CLA, T4-DB+2.5%AS+2%CLA.
CLA- ácido linoleico conjugado.

de luz. Agua y alimento fueron suministrados *ad libitum*. Durante todo el período se llevó un registro del consumo de alimento, producción de huevo, peso del huevo, masa de huevo y conversión alimenticia. El estudio se condujo en conformidad con las políticas establecidas por el Comité de Ética para el cuidado de los animales, de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Nacional Autónoma de México.

En la semana 4 se tomaron al azar 50 huevos por tratamiento (10 por réplica). Las yemas de cada réplica se mezclaron manualmente con una batidora para formar un "pool" (5 "pools" por tratamiento). El análisis de cada pool se hizo por duplicado. La extracción de lípidos en el huevo se realizó con cloroformo:etanol (1:1) (AOAC 2000, método 923.07). El extracto lipídico fue metilado con trifluoruro de boro al 20% en una solución metanólica al 2% (AOAC 2000, método 969.33). Las muestras se inyectaron en un cromatógrafo de gases Varian, modelo 3380 CX equipado con un automuestreador CP8400, detector de ionización de flama y columna DB23 de 30 m con un d.i. de 0,25 mm. Se utilizó al nitrógeno como gas acarreador a un flujo de 30 mL/min. Las temperaturas utilizadas fueron: columna 230 °C, inyector 150 °C, detector 300 °C. Para calcular la concentración de ácidos grasos se utilizó como patrón de referencia una mezcla de estándares de ácidos grasos con concentraciones conocidas y para el CLA el metil éster del ácido linoleico conjugado (Supelco® 37 FAME Mix SIGMA). La integración de los resultados se hizo mediante el programa Star Chromatography Workstation vs 6.3 Varian Associates, Inc. Los resultados se reportan en por ciento del total de ácidos grasos (%TAG).

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los datos se analizaron mediante un análisis de varianza para un diseño completamente al azar, utilizando el PROC GLM de SAS versión 6.12 para Windows (SAS System, USA) y contrastes ortogonales ($P < 0,05$) para la comparación de medias de las relaciones T1 (dieta testigo) vs T2, T3, T4 (tratamientos que incluían aceite de sardina); T2 (tratamiento que tenía AS pero no CLA) vs T3, T4 (tratamientos que incluían AS y CLA); y T3 (tratamiento con AS más 1%CLA) vs T4 (tratamiento con AS más 2% CLA).

RESULTADOS

ACEITES

En el aceite de soya utilizado en este estudio se detectaron AG a partir del mirístico (C14:0). Los ácidos grasos (AG) que predominaron en este aceite fueron el linoleico (C18:2 n6), oleico (C18:1 n9), palmítico (C16:0) y el alfa-linolénico (C18:3 n3) (53%, 22%, 11% y 7%, respectivamente). En el aceite de sardina (AS) se detectaron AG a partir del láurico (C12:0), siendo los más abundantes el

palmítico, EPA, LA, oleico y el DHA (19%, 14%, 14%, 12% y 10%, respectivamente). La relación n6:n3 en el aceite de soya fue de 7:1, mientras que en el aceite de sardina fue 0.54:1 (cuadro 1).

DIETAS

En la dieta T1 predominaron los ácidos grasos LA (C18:2), oleico (C18:1), palmítico (C16:0) y ALA (C18:3); en la T2 los ácidos mirístico (C14:0), palmítico (C16:0), palmitoleico (C16:1), EPA (C20:5 n3) y DHA (C22:6 n3); mientras que en las dos dietas restantes (T3 y T4), que además del AS tenían CLA, predominaron los ácidos mirístico, palmitoleico, esteárico, el CLA, EPA y DHA. En las tres dietas que incluían AS había más EPA (3.6-3.9%) que DHA (0.43-0.51%) y la relación n6:n3 fue de 1.3:1, mientras que en la testigo (T1) fue de 9:1 (cuadro 3).

ÁCIDOS GRASOS EN EL HUEVO

Suplementar las dietas con solo AS supuso cambios significativos en el contenido de AG en el huevo. En el caso de los ácidos grasos: palmítico (C16:0), palmitoleico (C16:1), oleico (C18:1), eicosapentaenoico (C20:5), docosapentaenoico (C22:5 n3 DPA) y docosahexaenoico (C22:6 n3 DHA) el incremento observado en la yema fue significativo ($P < 0,05$), mientras que la concentración del esteárico (C18:0), linoleico (C18:2 n6), alfa-linolénico (C18:3 n3) y araquidónico (C20:4 n6) se redujo significativamente en comparación con T1 (cuadro 4). La relación n6:n3 disminuyó notablemente, pasando de 11:3 (en T1) a 2:1 (en T2) (cuadro 5). Del total de los n3, más del 80% estaba conformado por la suma de los ácidos grasos EPA+DPA+DHA.

Sin embargo, cuando el CLA fue adicionado a las dietas suplementadas con AS la presencia de los AGS mirístico (C14:0), palmítico (C16:0) y esteárico (C18:0) en el huevo se incrementó significativamente ($P < 0,05$); lo mismo que la del ácido linoleico conjugado (CLA) y la de los AGn3, EPA (C20:5), DPA (C22:5) y DHA (C22:6) ($P < 0,05$). La relación n6:n3 se redujo aun más con respecto al grupo testigo, pasando de 11.3 (T1) a 1.4 y 1.3 en los tratamientos con AS+CLA (cuadro 5).

La concentración total de CLA en el huevo fue proporcional a la cantidad de CLA adicionada en las dietas ($r = 0,986$). Es decir, que el huevo del T3 presentó un total de 3,3% de CLA, mientras que el huevo del T4 tuvo 5,5% del total de ácidos grasos. Aun cuando en las dietas de ambos tratamientos la proporción de los isómeros del CLA, c9t11 y t10c12 era igual, en la yema predominó el cis 9 trans 11 (cuadro 4).

En general, se observó que suplementar las dietas con AS+CLA incrementó significativamente la cantidad de AGS en el huevo y la de los AGn3, EPA, DPA y DHA, mientras que la concentración de los AGM se redujo notablemente ($P < 0,05$) (cuadro 5).

Cuadro 4. Composición de ácidos grasos en el huevo de gallinas alimentadas con dietas que incluyen aceite de pescado y ácido linoleico conjugado.

Egg fatty acid composition when laying hens diets were supplemented with sardine oil and conjugated linoleic acid.

	Ácidos grasos (% total de ácidos grasos)													
	C14:0	C16:0	C18:0	C16:1	C18:1	C18:2	CLA		C18:3	C20:4	C20:5	C22:5	C22:5	C22:6
							C18:2	C18:2						
n6	c9,t11	t10,c11	n3	n6	n3	n6	n3	n3						
Contraste 1														
T1 vs	0,34	24,62	8,57	2,33	40,9	15,65	0,05	0,02	0,65	1,82	0,02	0,33	0,11	0,77
T2,T3,T4	0,59	30,31	16,43	1,97	29,57	8,63	2,02	0,96	0,34	0,55	0,53	0,05	0,97	3,92
Contraste 2														
T2 vs	0,48	26,90	7,95	3,61	42,66	9,46	0,07	0,12	0,37	0,65	0,41	0,03	0,35	3,12
T3, T4	0,64	32,02	20,66	1,15	23,02	8,22	3,00	1,38	0,32	0,51	0,59	0,05	1,28	4,31
Contraste 3														
T3 vs	0,68	32,45	19,13	1,35	24,56	8,52	2,26	1,01	0,35	0,54	0,59	0,06	1,20	4,48
T4	0,60	31,59	22,20	0,95	21,48	7,92	3,74	1,74	0,30	0,47	0,59	0,05	1,36	4,15
ESM	0,01	0,08	0,09	0,02	0,16	0,05	0,01	0,00	0,00	0,01	0,00	0,00	0,00	0,06
<i>P</i>														
Contraste 1	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
Contraste 2	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,002	0,000	0,000
Contraste 3	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,001	0,794	0,174	0,000	0,001

T1-Dieta base (DB), T2-DB+2,5%AS, T3-DB+2,5%AS+1%CLA, T4-DB+2,5%AS+2%CLA.
AS-aceite de sardina, CLA- ácido linoleico conjugado.

Cuadro 5. Total de ácidos grasos en el huevo de gallinas alimentadas con dietas que incluyen aceite de pescado y ácido linoleico conjugado.

Egg fatty acid composition when laying hens diets were supplemented with sardine oil and conjugated linoleic acid.

	Total AGS	Total AGM	Total AGPI	Total CLA	Total n6	Total n3	Relación n6:n3
Contraste 1							
T1 vs	33,53	43,23	19,42	0,07	17,81	1,55	11,18
T2,T3,T4	47,33	31,54	17,97	2,98	9,23	5,76	1,70
Contraste 2							
T2 vs	35,34	46,27	14,59	0,19	10,14	4,26	2,41
T3, T4	53,33	24,17	19,65	4,37	8,78	6,51	1,35
Contraste 3							
T3 vs	52,26	25,91	19,0	3,28	9,11	6,61	1,38
T4	54,39	22,43	20,31	5,47	8,44	6,40	1,32
ESM	0,10	0,17	0,08	0,01	0,05	0,07	0,11
<i>P</i>							
Contraste 1	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
Contraste 2	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
Contraste 3	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,034	0,711

T1-Dieta base (DB), T2-DB + 2,5% AS, T3-DB + 2,5% AS + 1% CLA, T4-DB + 2,5% AS + 2% CLA.
AS-aceite de sardina, CLA-ácido linoleico conjugado.

En el huevo, de los cuatro tratamientos no se detectó ninguno de los siguientes AGS: butírico (C4:0), caproico (C6:0), caprílico (C8:0), cáprico (C10:0), undecanoico (C11:0), láurico (C12:0), tridecanoico (C13:0), heneico-saenoico (C21:0), behénico (C22:0), tricosanoico (C23:0) y lignocérico (C24:0). De igual manera no se detectaron los siguientes AGM: erúxico (C22:1), cis-13,16-docosadienoico (22:2) y nervónico (C24:1).

Otros se detectaron en concentraciones menores al 1% del total de ácidos grasos. Este fue el caso de los AG: mirístico (C14:0), pentadecanoico (C15:1), cis10-pentadecenoico (C15:1), palmitelaídico (C16:1), heptadecanoico (C17:0), cis10-heptadecanoico (C17:1), elaídico (C18:1), linolelaídico (C18:2), gama-linolénico (C18:3n6), alfa-linolénico (C18:3n3), araquídico (C20:0), eicosenoico (C20:1), cis 11,14 eicosadienoico (C20:2), cis 11,14,17 eicosatrienoico (C20:3), cis 8,11,14 eicatrienoico (C20:3), eicosapentae-noico (C20:5 n3) y docosapentaenoico (C22:5 n6).

VARIABLES PRODUCTIVAS

La suplementación de las dietas únicamente con el aceite de sardina no afectó las variables productivas ($P > 0,05$) (cuadro 6). El color de la yema, lo mismo que las Unidades Haugh se vieron favorecidos ($P < 0,05$) por la adición de AS en la dieta. Sin embargo, cuando el AS se suministró junto con el CLA, cambios significativos fueron observados tanto en las variables productivas como en la calidad física del huevo ($P < 0,05$). Por un lado, la

producción, peso y masa del huevo fueron más bajas cuando se adicionó 1% de CLA a dietas suplementadas con AS, que cuando se incorporó 2% de CLA ($P < 0,05$). La mejor conversión alimenticia se presentó en las aves alimentadas con dietas que contenían AS+2% CLA ($P < 0,05$). Las Unidades Haugh se vieron afectadas en forma negativa al suplementar las dietas con AS+CLA. El color de la yema disminuyó cuando el CLA fue adicionado a las dietas suplementadas con AS ($P < 0,05$).

DISCUSIÓN

ÁCIDOS GRASOS EN ACEITES, DIETA Y HUEVO

La mayor concentración de EPA que DHA encontrada en el aceite de sardina utilizado en este estudio concuerda con lo señalado por Cachaldora y col (2006), en el sentido de que los aceites de sardina tienen más EPA (21%) que DHA (7%); mientras que en los aceites de atún sucede lo inverso (EPA 8% y DHA 21%). Sin embargo, contrario a lo observado en el aceite y las dietas, en la yema hubo una mayor deposición de DHA que de EPA. Esto pudiera estar relacionado con la mayor eficiencia de retención del DHA en los tejidos (Álvarez y col 2004) y con la mayor preferencia que los tejidos tienen por el DHA (González-Esquerria y Leeson 2001). A partir del EPA se forma una amplia variedad de compuestos biológicamente activos conocidos como eicosanoides (prostaglandinas y leucotrienos), que son potentes reguladores de la actividad

Cuadro 6. Variables obtenidas en gallinas alimentadas con dietas suplementadas con aceite de sardina y ácido linoleico conjugado. Productive parameters of laying hens fed with diets supplemented with sardine oil and conjugated linoleic acid.

	Consumo de alimento (g/ave/día)	Producción de huevo (%)	Peso de huevo (g)	Masa de huevo (g)	Conversión alimenticia*	Unidades Haugh	Color yema
Contraste							
T1 vs	114,95	83,70	67,25	56,45	2,07	74,5	8,74
T2,T3,T4	114,10	82,20	69,22	56,73	2,03	83,05	9,07
Contraste							
T2 vs	117,90	81,45	70,45	56,95	2,11	85,72	9,60
T3, T4	112,20	82,58	68,60	56,62	1,99	81,72	8,81
Contraste							
T3 vs	112,80	78,80	67,10	53,45	2,12	81,36	9,08
T4	111,60	86,35	70,10	59,80	1,85	80,91	8,54
ESM	1,50	1,61	0,55	1,28	0,04	1,24	0,11
P							
Contraste 1	0,641	0,424	0,004	0,846	0,413	0,000	0,007
Contraste 2	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,009	0,000
Contraste 3	0,591	0,001	0,000	0,001	0,000	0,683	0,000

T1-Dieta base (DB), T2-DB + 2,5% AS, T3-DB + 2,5% AS + 1% CLA, T4-DB + 2,5% AS + 2% CLA.

* kg alimento:kg de huevo.

biológica; este ácido graso puede ser elongado a DPA (C22:5 n3) y luego convertido a DHA (C22:6). Aunque el DHA no posee la capacidad de dar origen a eicosanoides, puede ser retroconvertido a EPA; siendo su aspecto más significativo ser componente estructural de las membranas celulares del sistema nervioso y de la retina. En estas membranas puede constituir aproximadamente el 60% de los AGPI presentes y es tal su importancia que algunas investigaciones señalan que una deficiencia de este ácido graso puede dar origen a algunas anomalías funcionales (Rice 1999).

La reducción de la relación n6:n3 en el huevo, cuando las dietas fueron suplementadas con AS y CLA, es un aspecto muy importante ya que, como se sabe, dos de los grupos más importantes de los ácidos grasos poliinsaturados (AGPI) son los n6 y los n3. Estos afectan el metabolismo de los eicosanoides, la expresión génica y la comunicación intercelular y no son interconvertibles en el cuerpo humano. Metabólica y funcionalmente son distintos y en muchos de los casos tienen efectos fisiológicos opuestos. Por tal motivo mantener un balance adecuado n6:n3 es de gran importancia. En este aspecto, se considera que una dieta típica occidental está desbalanceada (10:1), ya que tiene altos niveles de n6 y bajos de n3, lo cual se ha asociado con un aumento en el riesgo de padecer enfermedades cardiovasculares, ciertos tipos de cánceres, etc. (Gebauer y col 2006). La relación n6:n3 recomendada en una dieta habitual va de 1:1 a 4:1 (Yannakopoulos 2007).

Por otra parte, adicionar 2% de CLA a dietas suplementadas con 2,5% de AS resultó en una reducción de aproximadamente 50% del total de los AGM en el huevo, los cuales fueron reemplazados por AGS. Estos resultados concuerdan con lo reportado por Cherian y col (2002) cuando suministraron 2% de CLA + 3% de aceite de menhaden en la dieta de las aves. Álvarez y col (2004) también hallaron un efecto notable en el perfil de ácidos grasos en el huevo cuando suministraron en forma combinada aceite de pescado (0%, 1,4%, 2%) y CLA (1%, 3%, 5%) en la dieta de las aves. Ellos observaron un incremento lineal de los AGS: C14:0, C16:0 y C18:0 y un decremento lineal de C16:1, C18:1 y C18:2.

La explicación a esto radica en el hecho de que la enzima delta 9-desaturasa es la responsable de convertir los ácidos palmítico (C16:0) a palmitoleico (C16:1 n9) y el esteárico (C18:0) a ácido oleico (C18:1n9); sin embargo, el CLA ejerce un efecto inhibitorio sobre esta desaturasa, lo cual ocasionó una reducción en la concentración de los AGM y una acumulación de AGS en el huevo (Cherian y col 2002, Álvarez y col 2004, Huang y col 2008).

Algunos autores han observado que en los lípidos del suero, el CLA incrementa la concentración de los ácidos esteárico, docosatetraenoico y docosapentaenoico, y reduce la del palmitoleico, oleico y di-homo-gamma-linolénico. Al ser el CLA fácilmente incorporado en los fosfolípidos de la membrana celular la síntesis del AA es afectada ya que este ácido graso es reemplazado por el CLA en la misma.

Por lo tanto, la síntesis de eicosanoides a partir del AA se reduce al igual que la actividad de las enzimas delta-6, delta-9 y se presenta un incremento en la actividad de la delta-5 desaturasa (Huang y col 2008).

Se cree que suplementar la dieta de las aves con CLA junto con otra fuente de ácidos grasos como el oleico, linoleico o linolénico revierte estos efectos negativos (Kim y col 2007). Cuando Álvarez y col (2005) suplementaron la dieta para las aves con 2% CLA y 3% de aceite de girasol, observaron un aumento en la concentración de AGM y la disminución de CLA en el huevo.

El que la concentración de los AGn3: EPA, DPA y DHA en el huevo fuese superior cuando las dietas fueron suplementadas con AS+CLA concuerda con las observaciones de otros autores en el sentido de que el CLA mejora la síntesis y deposición de los AGn3 (Du y col 2000, Cherian y col 2002, Raes y col 2002). Emken (1984) menciona que los ácidos grasos 18:1 cis y trans reducen la síntesis de 20:4 y aceleran la síntesis de 20:5 n3 y 20:3 n9.

Por otra parte, fue interesante observar que la concentración de los isómeros de CLA encontrados en el huevo no fue un reflejo de las proporciones de estos en la dieta. La proporción de los isómeros c9, t11 y t10, c12 en las dietas fue casi igual (50% y 50%), sin embargo, en el huevo estas proporciones difirieron notablemente. Esto concuerda con lo señalado por otros autores (Chamruspollert y Sell 1999, Shang y col 2004) quienes encontraron que c9, t11 es el principal isómero que se deposita en yema, constituyendo aproximadamente 50 a 65% del total de CLA en el huevo.

La razón por la cual este isómero se deposita en mayor concentración en el huevo no es muy clara aún, sin embargo se sabe que algunos isómeros son mejor metabolizados que otros (Shang y col 2004), y que la forma trans de los AG es termodinámicamente más estable que la configuración cis, por lo tanto son menos reactivos químicamente (Sadler y Watford 1999).

Estudios *in vitro* e *in vivo* han mostrado que el CLA tiene un efecto antioxidante, más potente que el alfa-tocoferol y el beta-caroteno (Huang 2008), atribuyéndose esta acción al isómero t10, c12 (Leung y Liu 2000). Es posible que con ello se favoreciera el incremento de n3 observado en el huevo, cuando las dietas fueron suplementadas con AS y CLA. Sin embargo, en esta área falta mucho por estudiar, pues los mecanismos y efectos no son muy claros aún.

En general, un huevo estándar contiene aproximadamente 106 mg de AGn3 (1,3% TAG) en 100 g de huevo completo, de los cuales 48 mg son de ALA (0,6% TAG) y 58 mg de DHA (0,73% TAG); las concentraciones de CLA en el mismo se sitúan en niveles no detectables¹. La ingesta diaria recomendada de EPA+DHA es de 300 a 500 mg/d, para el ALA es de 800 a 1.100 mg/d; y en el caso del CLA, se considera que 3 g/d son necesarios para poder observar efectos benéficos en la salud (Kris-Etherton y col 2002, Aydin 2005). Por lo tanto, las concentraciones de AGn3

¹ www.aeb.org

y de CLA en el huevo alcanzadas en el presente estudio, al suplementar la dieta de las aves con aceite de sardina y CLA, son superiores a un huevo convencional.

VARIABLES PRODUCTIVAS

Diversos autores señalan que al suplementar las dietas para gallinas ponedoras con aceite de pescado, variables como la producción y peso del huevo se ven disminuidas. En el presente estudio, con la adición de 2,5% de AS en la dieta no se observaron tales efectos. Esto concuerda con lo informado por Cornejo y col (2008) y Cherian y col (2007) quienes tampoco encontraron cambios en las variables productivas al incorporar 6% de AP en el primer caso; así como 0,25% y 0,5% de AP en el segundo caso. Asimismo, Cachaldora y col (2006, 2008) no encontraron efecto alguno sobre el peso del huevo al suplementar la dieta de las aves con diferentes tipos de aceites de pescado y diferentes niveles de inclusión del mismo (1,5%, 3%, 4,5% y 6,0%).

Sin embargo, sería conveniente prolongar el tiempo de experimentación para poder determinar los efectos a largo plazo, ya que autores como Hargis y col (1991) observaron efectos negativos en las aves al suplementar la dieta de las aves con aceite de pescado por períodos largos. Otros han observado una disminución en la producción y peso del huevo, atribuyendo tal comportamiento al efecto reductor de los AGn3 sobre la cantidad de lípidos y estradiol en suero (lo que limitaría la disponibilidad de lípidos para la formación de yema) (González-Esquerria y Leeson, 2001, Cachaldora y col 2006). Es posible que otros factores también pudieran estar influyendo en ello, ya que la disminución en el peso del huevo también fue observada por Herber y Van Elswyk (1996) al adicionar una microalga marina con alto contenido de DHA en la dieta de las aves; y por otros investigadores cuando utilizaron sebo (5 a 7%), como única fuente de grasa en dietas para gallinas ponedoras (Watkins y Elkin 1992, Grobas y col 2001, González-Muñoz y col 2009).

Por otra parte, los resultados obtenidos en este estudio al suplementar la dieta con AS + CLA difieren de los observados por Álvarez y col (2004), quienes en su estudio no encontraron efecto alguno sobre las variables productivas de las aves y color de la yema al suplementar la dieta con aceite de pescado (1,4% y 2%) y CLA (1,3 y 5%). En nuestro estudio el incremento en el color de la yema en los tratamientos donde la dieta se suplementó con AS pudo deberse a la presencia de pigmentos presentes en el aceite. Sin embargo, la reducción en el color de la yema observada en los tratamientos T3 y T4, donde las dietas se suplementaron con CLA, fue observada también por Aydin y col (2001).

Por último, es importante señalar que suplementar la dieta de las aves con CLA implicará un incremento en los costos de alimentación y por consecuencia en el huevo, ya que actualmente el kg de CLA (Lutrell Pure granulado)

tiene un costo de \$ 12 USD/kg (comunicación personal). Por lo tanto, habrá que tomar en cuenta este aspecto al momento de formular las raciones.

Se concluye que suplementar la dieta con AS incrementa la concentración de los ácidos grasos omega 3 EPA, DPA y DHA en el huevo, pero adicionar CLA a estas dietas favorece aun más la deposición de estos ácidos grasos en el mismo. Aun cuando la concentración de AGS en el huevo aumenta con la inclusión de CLA en las dietas de las gallinas, la relación n6:n3 se reduce, constituyendo por tanto una alternativa para hacer llegar al consumidor estos compuestos bioactivos.

RESUMEN

Actualmente el consumo regular de ácidos grasos omega 3 (C18:3 ALA, C20:5 EPA, C22:6 DHA) y de ácido linoleico conjugado (C18:2 CLA) es recomendado debido a la importancia que estos compuestos bioactivos tienen en la prevención y control de enfermedades cardiovasculares, diabetes y diferentes tipos de cáncer. El objetivo de este estudio fue determinar el efecto sobre la composición en ácidos grasos del huevo cuando la dieta de las gallinas es suplementada con aceite de sardina y CLA. 240 gallinas Bovans White fueron distribuidas aleatoriamente en cuatro tratamientos con cinco réplicas de 12 aves cada una. Los tratamientos fueron: testigo (T1) con una dieta basal, la misma que T1 más 2,5% de aceite de sardina (T2), la misma que T2 pero adicionando 1% y 2% de CLA (T3 y T4 respectivamente). El ensayo experimental tuvo una duración de cuatro semanas. Al final de este período, 50 huevos de cada tratamiento fueron tomados para realizar la determinación de ácidos grasos por cromatografía de gases. Con respecto al tratamiento testigo, los resultados mostraron un incremento en la concentración total de ácidos grasos omega 3 (1,6% vs 6,0% del total de ácidos grasos) y de CLA (0,7% vs 3-5% del total de ácidos grasos) en el huevo de los tratamientos T3, T4 y T5 en conjunto, y una relación n6:n3 de 11:1 vs 1.3:1 ($P < 0,05$). Se concluye, que al suplementar la dieta de las gallinas ponedoras con aceite de sardina y ácido linoleico conjugado se obtendrán huevos con doble valor agregado.

AGRADECIMIENTOS

Se agradece al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca otorgada al primer autor, al Programa Texas A&M University-CONACYT por financiar parcialmente este estudio, parte de una tesis doctoral, y a BASF Mexicana por donar el CLA.

REFERENCIAS

- Álvarez C, P Cachaldora, J Méndez, P García-Rebollar, JC De Blas. 2004. Effects of dietary conjugated linoleic acid and fish oil supplementation on performance and egg quality in laying hens. *Br Poult Sci* 45, 524-529.
- Álvarez C, P García-Rebollar, P Cachaldora, J Méndez, JC De Blas. 2005. Effects of dietary conjugated linoleic acid and high-oleic sunflower oil on performance and egg quality in laying hens. *Br Poult Sci* 46, 80-86.
- AOAC, Association Official of Analyst Chemical. 2000. *Official methods of analysis*. AOAC International, Gaithersburg, USA.
- Aydin R, MW Pariza, ME Cook. 2001. Olive oil prevents the adverse effects of dietary conjugated linoleic acid on chick hatchability and egg quality. *J Nutr* 32, 3105-3112.
- Aydin R. 2005. Conjugated linoleic acid: chemical structure, sources and biological properties. *Turk J Vet Anim Sci* 29, 189-195.

- Cachaldora P, P García-Rebollar, C Álvarez, JC De Blas, J Méndez. 2006. Effect of type and level of fish oil supplementation on yolk fat composition and n-3 fatty acids retention efficiency in laying hens. *Brit Poult Sci* 47, 43-49.
- Cachaldora P, P García-Rebollar, C Álvarez, JC De Blas, J Méndez. 2008. Effect of type and level of basal fat and level of fish oil supplementation on yolk fat composition and n-3 fatty acids deposition efficiency in laying hens. *Anim Feed Sci Tech* 141, 104-114.
- Castillo-Badillo C, J Vázquez-Valladolid, M González-Alcorta, E Morales-Barrera, R Castillo-Domínguez, S Carrillo-Domínguez. 2005. El aceite de atún como fuente de ácidos grasos w-3 en el huevo de gallina. *Grasas y Aceites* 56, 153-159.
- Chamruspollert M, J Sell. 1999. Transfer of dietary conjugated linoleic acid to egg yolks of chickens. *Poult Sci* 78, 1138-1150.
- Cherian G, M Goeger, D Ahn. 2002. Dietary conjugated linoleic acid with fish oil alters yolk n3 and trans fatty acid content and volatile compounds in raw cooked, and irradiated eggs. *Poult Sci* 81, 1571-1577.
- Cherian G, D González, K Ryu, M Goeger. 2007. Long-term feeding of conjugated linoleic acid and fish oil to laying hens; effects on hepatic histopathology, egg quality, and lipid components. *J Appl Poult Res* 16, 420-428.
- Cherian G. 2008. Egg quality and yolk polyunsaturated fatty acid status in relation to broiler breeder hen age and dietary n-3 oils. *Poult Sci* 87, 1131-1137.
- Cornejo S, H Hidalgo, J Araya, J Pokniak. 2008. Suplementación de dietas de gallinas de postura comercial con aceites de pescado de diferentes grados de refinación. Efectos productivos en las aves y en la calidad organoléptica de los huevos. *Arch Med Vet* 40, 45-50.
- CPI, Centurion Poultry Incorporated. 2008. Bovans White management guide. Centurion Poultry, Inc. North American Edition, Lexington, USA.
- Du M, DU Ahn, JL Sell. 2000. Effects of dietary conjugated linoleic acid and linoleic: linolenic acid ratio on polyunsaturated fatty acid status in laying hens. *Poult Sci* 79, 1749-1756.
- Emken E. 1984. Nutrition and biochemistry of trans and positional fatty acid isomers in hydrogenated oils. *Ann Rev Nutr* 4, 339-376.
- Gebauer SK, TL Psota, WS Harris, PM Kris-Etherton. 2006. N-3 Fatty acid dietary recommendations and food sources to achieve essentiality and cardiovascular benefits. *Am J Clin Nutr* 83 (suppl), 1526S-1535S.
- González-Esquerria R, S Leeson. 2000. Effect of feeding hens regular or deodorized menhaden oil on production parameters, yolk fatty acid profile, and sensory evaluation of eggs. *Poult Sci* 79, 1597-1602.
- González-Esquerria R, S Leeson. 2001. Alternatives for enrichment of eggs and chicken meat with omega-3 fatty acids. *Can J Anim Sci* 81, 295-305.
- González-Muñoz M, S Bastida, O Jiménez, de C Lorenzo, G Vergara, F Sánchez-Muñiz. 2009. The effect of dietary fat on the fatty acid composition and cholesterol content of the eggs from Hy-line and Warren hens. *Grasas y Aceites* 60, 350-359.
- Grobas S, J Méndez, R Lázaro, C de Blas, G Mateos. 2001. Influence of source and percentage of fat added to diet on performance and fatty acid composition of egg yolk of two strains of laying hens. *Poult Sci* 80, 1171-1179.
- Hargis P, M Van Elswyk, B Hargis. 1991. Dietary modification of yolk lipid with menhaden oil. *Poult Sci* 70, 874-883.
- Herber SM, ME Van Elswyk. 1996. Dietary marine algae promote efficient deposition of n3 fatty acids for the production of enriched shell eggs. *Poult Sci* 75, 1501-1507.
- Holub B. 2002. Clinical nutrition: 4. Omega-3 fatty acids in cardiovascular care. *Can Med Assoc J* 166, 608-615.
- Huang Y-S, T Yanagita, K Nagao. 2008. Biological effects of conjugated linoleic acid. In: Ching Kuang Chow (ed). *Fatty Acids in Foods and their Health Implications*. 3rd ed. CRC Press, Boca Raton, Florida, USA, Pp 825-836.
- Hunter J. 2008. Safety and health effects of trans fatty acids. In: Ching Kuang Chow (ed). *Fatty acids in foods and their health implications*. 3rd ed. CRC Press, USA, Pp 757-790.
- Ip C. 1997. Review of the effects of trans fatty acid, oleic acid, n-3 polyunsaturated fatty acids, and conjugated linoleic acid on mammary carcinogenesis in animals. *Am J Clin Nutr* 66, 1523-1529.
- Kim JH, J Hwangbo, NJ Choi, HG Park, DH Yoon, EW Park, SH Lee, Bk Park, YJ Kim. 2007. Effect of dietary supplementation with conjugated linoleic acid, with oleic, linoleic, or linolenic acid, on egg quality characteristics and fat accumulation in the egg yolk. *Poult Sci* 86, 1180-1186.
- Kralik G, Z Gajcevic, Z Skrtic. 2008. The effect of different oil supplementations on laying performance and fatty acid composition of egg yolk. *Ital J Anim Sci* 7, 173-183.
- Kris-Etherton PM, Harris WS, Appel LJ. 2002. Fish consumption, fish oil, omega-3 fatty acids, and cardiovascular disease. *Circulation* 106, 2747-2757.
- Leung YH, RH Liu. 2000. Trans 10, cis 12-Conjugated linoleic acid isomer exhibits stronger oxyradical scavenging capacity than cis-9, trans-11-conjugated linoleic acid isomer. *J Agric Food Chem* 48, 5469-5475.
- Pariza M, Y Ha. 1990. Conjugated dienoic derivatives of linoleic acid a new class of anticarcinogens. *Med Oncol Tumor Pharmacother* 7, 169-171.
- Raes K, G Huyghebaert, S De Smet, L Nolle, S Arnouts, D Demeyer. 2002. The deposition of conjugated linoleic acids in egg of laying hens fed diets varying in fat level and fatty acid profile. *J Nutr* 132, 182-189.
- Rice R. 1999. Fish nutritional value. In: Sadler MJ, Strain JJ, Caballero B (eds). *Encyclopedia of Human Nutrition*. Volume II. Academic Press, San Diego, USA, Pp 793-803.
- SAS. Statistical Analysis System. 2008. The SAS System for Windows Release 6.2 USA.
- Sadler M, I Watford. 1999. Health effects of trans fatty acids. In: Sadler MJ, Strain JJ, Caballero B (eds). *Encyclopedia of Human Nutrition*. Volume II. Academic Press, San Diego, USA, Pp 769-776.
- Sanhueza C, K Nieto, B Valenzuela. 2002. Ácido linoleico conjugado: un ácido graso con isomería trans potencialmente beneficioso. *Rev Chil Nutr* 29, 98-105.
- Shang XG, FL Wang, DF Li, JD Yin, JY Li. 2004. Effects of conjugated linoleic acid on the productivity of laying hens and egg quality during refrigerated storage. *Poult Sci* 83, 1688-1695.
- Suksombat W, S Samitayotin, P Lounglawan. 2006. Effects of conjugated linoleic acid supplementation in layer diet on fatty acid compositions of egg yolk and layer performances. *Poult Sci* 85, 1603-1609.
- Watkins B, R Elkin. 1992. Dietary modulation of oleic and stearic acids in egg yolks. *J Food Comp Anal* 5, 209-215.
- Yannakopoulos A. 2007. Egg enrichment in omega-3 fatty acids. In: Rainer H, López-Fandiño R, Anton M, Schade R (eds). *Bioactive Egg Compounds*. Springer-Verlag, Berlin, Germany, Pp 159-170.